

***In vitro* Untersuchungen zum relativen phototoxischen
und photogentoxischen Potential natürlich
vorkommender Furocumarine und Limettin**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen
Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte

Dissertation

(D 386)

Vorgelegt von

Diplom-Chemikerin Nicole Raquet

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk
Eröffnung des Promotionsverfahrens: 24.11.2010
Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 31.05.2011

Kaiserslautern 2011

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde zwischen Mai 2007 und Juli 2010 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Kaiserslautern im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk durchgeführt.

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Helmut Sitzmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand

Für meine Familie

Die Sonne lehrt alle Lebewesen die Sehnsucht
nach dem Licht. Doch es ist die Nacht, die uns
alle zu den Sternen erhebt.

Khalil Gibran

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Deutsche Kurzfassung	IX
Abstract.....	XI
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Risikobewertung.....	3
2.2 Mischungen chemischer Stoffe	5
2.2.1 Konzepte der kombinierten Wirkung chemischer Stoffe	5
2.2.2 Experimentelle Ansätze.....	7
2.2.3 Risikobewertung von Mischungen chemischer Stoffe	10
2.3 Licht.....	12
2.4 Desoxyribonukleinsäure (DNA).....	15
2.4.1 Aufbau und Struktur der DNA	15
2.4.2 Schäden an der DNA und mögliche Folgen	18
2.4.2.1 Zellzyklusarrest & Apoptose	19
2.4.2.2 Reparatur	20
2.4.2.3 Mutationen.....	22
2.4.2.4 Kanzerogenese.....	23
2.5 Furocumarine.....	24
2.5.1 Vorkommen	27
2.5.2 Biosynthese.....	29
2.5.3 Toxikokinetik / Toxikodynamik.....	30
2.5.3.1 Exposition.....	30
2.5.3.2 Resorption / Kinetik	30
2.5.3.3 Metabolismus / Interaktion mit Enzymsystemen	32
2.5.4 Wirkungen von Furocumarinen ohne Lichteinfluss	34
2.5.5 Wirkungen von Furocumarinen in Kombination von UVA-Licht	36
2.5.5.1 Photophysik	36
2.5.5.2 Photochemie/-biologie.....	37
2.5.5.2.1 Kovalente Bindung an die Basen der DNA.....	37
2.5.5.2.2 Kovalente Bindung an weitere Biomoleküle.....	40
2.5.5.2.3 Photolyse / Dimerisierung	41
2.5.5.2.4 Reaktionen mit molekularem Sauerstoff.....	41
2.5.5.3 Effekte auf den Organismus	44
2.5.6 Anwendungen von Furocumarinen / PUVA-Therapie / ECP	46
2.5.7 Bewertung von Furocumarinen	47
2.6 Methodische Grundlagen.....	49
2.6.1 V79-Zelllinie	49
2.6.2 Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT).....	50
2.6.3 Mikrokern	52
2.6.3.1 Entstehung von Mikrokernen	53
2.6.3.2 Wirkweisen clastogener Substanzen	54
2.6.3.3 Mikrokern-Testsysteme (MNAs)	57
3 Zielstellung	61
4 Materialien.....	63
4.1 V79-Zelllinie	63
4.2 UV-Bestrahlungskammer	63

4.3 Chemikalien	64
4.4 Verbrauchsmaterial	66
4.5 Geräte	66
4.6 Software	67
5 Methoden.....	69
5.1 Zellkultur	69
5.1.1 Kultivierung und Passagieren der V79-Zelllinie.....	69
5.1.2 Bestimmung der Zellzahl	70
5.1.3 Einfrieren von Zellen	70
5.1.4 Auftauen von Zellen.....	71
5.2 Methoden zur Erfassung photochemisch induzierter Toxizität.....	71
5.2.1 Resazurin-Reduktionstest.....	72
5.2.2 Neutralrot-Aufnahme-Test	74
5.2.3 Protein-Bestimmung (Bicinchoninsäure(BCA)-Assay).....	76
5.3 Methoden zur Erfassung photochemisch induzierter Gentoxizität	77
5.3.1 Photo-HPRT-Genmutationstest.....	77
5.3.2 Photo-Mikrokerntest.....	80
5.4 Methoden zur Erfassung der DNA-Interkalation	82
5.4.1 Interkalation zwischen die Basen der DNA	82
5.4.2 Ethidiumbromid- / Hoechst 33258 - Kompetitionsassay	84
5.5 Methoden zur Erfassung photochemisch gebildeter ROS.....	87
5.5.1 Detektion von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$).....	87
5.5.2 Detektion von Superoxidradikalanionen ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	88
5.6 Statistik.....	90
5.7 Positivkontrollen	91
6 Ergebnisse	95
6.1 Allgemeines.....	95
6.2 Phototoxizität: Charakterisierung am Beispiel von 5-MOP und Etablierung einer geeigneten Methode	97
6.2.1 Wahl des Testsystems	98
6.2.2 Wahl der geeigneten Nachinkubationszeit / Charakterisierung phototoxischer Effekte	101
6.2.3 Wahl der geeigneten Strahlungsdosis	106
6.3 Phototoxizität: Ergebnisse Resazurin-Reduktionstest.....	112
6.3.1 Resazurin-Reduktionstest, alle Reinsubstanzen.....	112
6.3.2 Resazurin-Reduktionstest, Mischungen	114
6.3.2.1 Resazurin-Reduktionstest: Isobolographische Analyse	114
6.3.2.2 Vergleich über PTEF-Konzept / Interaktions-Index CI	115
6.4 Photo-HPRT-Genmutationstest.....	119
6.4.1. Photo-HPRT-Assay: Zusammenhang Furocumarin-Konzentration / UVA-Dosis	120
6.4.2 Photo-HPRT-Assay: Ergebnisse aller Reinsubstanzen	130
6.4.3 Photo-HPRT-Assay: Ergebnisse der Furocumarin-Mischungen	132
6.4.3.1 Isobolographische Analyse	132
6.4.3.2 Vergleich über Interaktions-Index CI	134
6.4.3.3 Vergleich über PMEF-Konzept.....	134
6.5 Photo-Mikrokern-Test (MNA)	139
6.5.1 Photo-Mikrokern-Test: Zusammenhang Furocumarin-Konzentration / UVA-Dosis.....	140
6.5.2 Photo-Mikrokern-Test: Ergebnisse aller Reinsubstanzen	147
6.5.3 Photo-Mikrokern-Test: Ergebnisse der Mischungen	148

6.5.3.1 Isobolographische Analyse.....	148
6.5.3.2 Vergleich über Interaktions-Index CI.....	150
6.5.3.3 Vergleich über PCEF-Konzept.....	151
6.6 Absorptionsspektren	154
6.7 Interkalation zwischen DNA-Basen	156
6.7.1 Hypochromer Effekt.....	157
6.7.2 Rotverschiebung des Absorptionsmaximums λ_{\max}	161
6.8 Ethidiumbromid- / Hoechst 33258-Kompetitionsassay	164
6.8.1 Ethidiumbromid-Kompetitionsassay	164
6.8.2 Hoechst 33258-Kompetitionsassay	165
6.9 Photoproduktion reaktiver Sauerstoffspezies	167
6.9.1 Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$).....	167
6.9.2 Photoproduktion von Superoxidradikalanionen ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	170
7 Diskussion	173
7.1 Einzelbetrachtung der Furocumarine.....	177
7.2 Allgemeine Faktoren zur Beeinflussung der Photoreaktivität.....	188
7.2.1 Struktur	188
7.2.1.1 Angulare / lineare Struktur	188
7.2.1.2 Substituenten	190
7.2.2 Lipophilie	194
7.2.3 Weitere Faktoren und Ausblick.....	195
7.3 Zusammenfassende Diskussion des PXEF-Konzepts	196
7.3.1 Ausnutzung linearer Zusammenhänge für PMEF- / PCEF-Konzept	196
7.3.2 PTEF-Konzept.....	199
7.4 Diskussion der Mischungen.....	200
7.5 Exakte Bestimmung der Effekte und Wirkmechanismen / Ausblick	204
7.6 Relevanz des PXEF-Konzepts in vivo / Ausblick.....	206
8 Zusammenfassung	215
9 Literaturverzeichnis	221
Danksagung	i
Eidesstattliche Erklärung.....	ii
Veröffentlichungen.....	iii
Originalpublikationen.....	iii
Posterbeiträge	iii
Lebenslauf	v
Anhang	viii
Nicht gezeigte Ergebnisse des HPRT-Assays	viii
Nicht gezeigte Ergebnisse des Mikrokerntests.....	xi
Absorptionsspektren der Furocumarine.....	xiv
Positivkontrollen im Ethidiumbromid- und Hoechst33258-Verdrängungsassay	xxvi

Abkürzungsverzeichnis

A	Angelicin
AfE	Alkalische Filterelution
AhR	Aryl Hydrocarbon Rezeptor
ANOVA	one-way analysis of variance
AP-Stelle	apurine / apyrimidine Stelle
AR	Archangelicin
AS	Aminosäure
A/T	Adenin/Thymin
AU	Absorbance unit bzw. Einheit für die Absorption
BCA	Bicinchoninsäure
BER	base excision repair oder Basen-Exzisions-Reparatur
Bgm	Bergamottin
bidest	bidestilliert
bp / BP	base pair / Basenpaar
BSA	Bovines Serum-Albumin
BY	Byakangelicin
CA	Cycloaddition
Caspase	CysteinyI aspartat-specific proteinase
CB	cytokinesis block bzw. Zytokinese-Block oder Cytochalasin B
CDK	Cyclin-dependent kinases bzw. Cyclin-abhängigen Kinasen
CE	Cloning Efficiency bzw. Klonier-Effizienz
CIE	Commission Internationale de L'Eclairage bzw. Internationale Beleuchtungskommission
CMR	Kanzerogen, mutagen, reproduktionstoxisch
CREST	Calcinosis cutis, Raynauds-Phänomen, esophageale Dysfunktion, Sklerodaktylie, Teleangiektasien
CYP	Cytochrom P450
d	Tag
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DB	Doppelbindung
DES	Diethylsulfat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DHB	(R)-6',7'-Dihydroxybergamottin
DMEM	Dulbecco's modified Eagles Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA _{DS}	Double-stranded DNA bzw. Doppelstrang-DNA
DNA _{SS}	Single-stranded DNA bzw. Einzelstrang-DNA
DRC	Dose-Response Curve bzw. Dosis-Wirkungs-Beziehung
DSB	Doppelstrangbruch

EC ₅₀	Konzentration, bei der ein Effekt von 50% des Maximaleffekts erreicht wird
ECP	Extracorporeal Photophoresis bzw. Extrakorporale Photopherese
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor bzw. Epidermaler Wachstumsfaktor
EM	Elektromagnetisch
EMS	Ethylmethansulfonat
ENNG	N-Ethyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
ENU	N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff
EpB	Epoxybergamottin
EtBr	Ethidiumbromid (
FaPy	2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin
FC	Furocumarin
FDA	US Food and Drug Administration
FI	Fluoreszenz-Intensität
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FKS	Fötales Kälber Serum
g	Gramm / Erdbeschleunigung [9,81ms ⁻²]
G/C	Guanin/Cytosin
GGR	Globale Genomreparatur
GI	Gastrointestinal
GMP	Guanylat oder Guanosinmonophosphat
GSH	Glutathion bzw. γ-Glutamylcysteinylglycin
H	Heraclenin
HI	Hazard Index
HMPC	Committee on Herbal Medicinal Products
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HR	Homologe Rekombination
I	Imperatorin
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICL	Interstrand-Crosslink bzw. Interstrang-Querverbindung
IMP	Inosinat oder Inosinmonophosphat
i.p.	intraperitoneal
IP	Isopimpinellin
ISC	Intersystem Crossing
IsI	Isoimperatorin
i.v.	intravenös
kb	kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton (1Da = 1u)
KG	Körpergewicht
L	Limettin
LD ₅₀	Letale Dosis, bei der 50% des Kollektivs sterben
λ _{max}	Wellenlänge des Absorptionsmaximums
logP _{OW}	dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten einer Substanz in n-Oktanol / Wasser

logS	dekadischer Logarithmus der Löslichkeit einer Substanz in Wasser (25°C, pH = 7,5) in mol/l
LPO	Lipid-Peroxidation
MA	Monoaddukt
MF	Mutationsfrequenz
MGMT	O ⁶ -Methyl-Guanin-Methyltransferase
MMC	Mitomycin C
MN	Mikronucleus bzw. Mikrokern
MNA	Mikronucleus-Assay bzw. Mikrokerntest
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
MOE	Margin of Exposure bzw.
5-MOP	5-Methoxypsoralen (Bergapten)
8-MOP	8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Zahl voneinander unabhängige Versuche / nicht-bindendes Molekülorbital
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid (ox. Form)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (red. Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotid-Phosphat (red. Form)
NaPi-Puffe	Natriumphosphat-Puffer
n.d.	nicht detektierbar
NER	nucleotide excision repair oder Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	non homologues end joining
N-Medium	FKS- und P/S-haltiges Nährmedium
NR	Neutralrot (N ⁸ ,N ⁸ ,3-Trimethyl-2,8-phenazindiaminmonohydrochlorid)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OxH	Oxypeucedaninhydrat
OMe	Methoxy- bzw. -OCH ₃
Oxp	Oxypeucedanin
Φ	Quantenausbeute: Verhältnis eingetretener Ereignisse zu eingesetzten Photonen
π	bindendes π-Molekülorbital
π*	antibindendes π-Molekülorbital
P	Psoralen
PA	Paradisins A (4-[[6-Hydroxy-7-[[1-[(1-hydroxy-1-methyl)ethyl]-4-methyl-6-(7-oxo-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-4-yl)-4-hexenyl]oxy]-3,7-dimethyl-2-octenyl]oxy]-7H-furo[3,2-k][1]benzopyran-7-on)
PB	Paradisins B (4-[[6-hydroxy-7-[[4-methyl-1-(1-methylethenyl)-6-(7-oxo-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-4-yl)-4-hexenyl]oxy]-3,7-dimethyl-2-octenyl]oxy]-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on)
PbPk	Physiologically-based pharmacokinetic modeling
PBS ⁺⁺	phosphate buffered saline, Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei, bzw. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei
PC	Paradisins C (4-(6R,7-Dihydroxy-3,7-dimethyl-2E-octen-1-yloxy)-7H-furo[3,2-g]chromen-spiro-7R,2'-(4',4'-dimethyl-5'R-(3-methyl-

	5-(7-oxo-furo[3,2-g]chromen-4-yloxy)-3 <i>E</i> -penten-1-yl)-1',3'-dioxolan)
PCB	Polychloriertes Biphenyl
PCEF	Photoclastogenicity equivalency factor bzw. Photoclastogenitäts-Äquivalenzfaktor
PCEQ	Photoclastogenicity equivalent bzw. Photoclastogenitäts-Äquivalent
PH	Phellopterin
PHA	Phytohämaglutinin
PIF	Photo-Irritation-Factor
PMEF	Photomutagenicity equivalency factor bzw. Photomutagenitäts-Äquivalenzfaktor
PMEQ	Photomutagenicity equivalent bzw. Photomutagenitäts-Äquivalent
PODI	Point of Departure Index
PP _i	Pyrophosphat oder Diphosphat (P ₂ O ₇ ⁴⁻)
PRPP	Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
P/S	Penicillin/Streptomycin
PTEF	Phototoxicity equivalency factor bzw. Phototoxizitäts-Äquivalenzfaktor
PTEQ	Phototoxicity equivalent bzw. Phototoxizitäts-Äquivalent
PUVA	Psoralen + UVA
qPCR	quantitative polymerase chain reaction oder quantitative Polymerase-Kettenreaktionen
QSAR	Quantitative structure activity relationship
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species bzw. Reaktive Sauerstoff-Spezies
RT	Raumtemperatur, 23°C
S ₁	1. Angeregter Singulett-Zustand
SCE	Sister chromatid exchange bzw. Schwesterchromatid-Austausch
SD	standard deviation bzw. Standardabweichung
SKLM	Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln
S-Medium	P/S-haltiges Nährmedium
SOD	Superoxid-Dismutase
T ₁	1. Angeregter Triplett-Zustand
TCR	Transcription-coupled repair bzw. transkriptionsgekoppelte Reparatur
TEF	Toxicity Equivalency Factor bzw. Toxizitäts-Äquivalenz-Faktor
TG	6-Thioguanin bzw. 2-Amino-6-mercaptapurin
TG-Medium	TG-haltiges Nährmedium
TMP	4,5',8-Trimethylpsoralen
UDS	unscheduled DNA synthesis bzw. außerplanmäßige DNA-Synthese
UVA	Ultraviolettstrahlung im Wellenlängenbereich von 315-400nm
UVB	Ultraviolettstrahlung im Wellenlängenbereich von 280-315nm
UVC	Ultraviolettstrahlung im Wellenlängenbereich von 200-280nm
X	Xanthotoxol
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2 <i>H</i> -tetrazolium-5-carboanilide

Deutsche Kurzfassung

Furocumarine (FC) sind sekundäre Pflanzenmetaboliten, die u.a. von Früchten und Gemüse wie Grapefruit oder Sellerie als Phytoalexine gebildet werden. So liegt die geschätzte durchschnittliche menschliche Exposition über die Nahrung bei einer Gesamt-FC-Menge von 0,56 mg/Tag in Deutschland, bei Akutexpositionen können 100-fach höhere Werte erreicht werden. Ihre Grundstruktur besteht aus einem Cumarinmolekül mit linear oder angular ankondensiertem Furanring, zudem können sie unterschiedlich substituiert sein: über 90 verschiedene natürlich vorkommende Derivate bekannt, die sich in der Ausprägung ihrer Eigenschaften stark unterscheiden. In Kombination mit UVA-Strahlung wirken FCs wie das Cumarin Limettin phototoxisch, photomutagen und photoclastogen.

Da in Pflanzen FCs hauptsächlich in Mischungen verschiedener Derivate vorkommen, wurde im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* an V79-Zellen ein einfaches Instrument zur Bewertung natürlich vorkommender FC-Gemische entwickelt, welches die relative phototoxische, -mutagene und -clastogene Potenz verschiedener FCs berücksichtigt. Hierzu wurden versch. Assays speziell für photochemische Anwendungen etabliert und optimiert:

Die phototoxischen Effekte wurden über den Resazurin-Reduktionstest charakterisiert und quantifiziert, die Quantifizierung des photomutagenen Potentials erfolgte mit Hilfe des HPRT-Assays, die des photoclastogenen über den Mikrokerntest. Am Beispiel von 5-Methoxypsoralen (5-MOP) konnte eine Abhängigkeit des EC_{50} -Wertes der Zellvitalität 72 h nach der Bestrahlung, der Erhöhung der Mutationsfrequenz (MF) und der Erhöhung der Zahl mikrokerntragender Zellen (MNZ) sowohl von der 5-MOP-Konzentration als auch von der applizierten UVA-Dosis gezeigt werden; im HPRT-Assay und Mikrokerntest waren strikt lineare Zusammenhänge zu beobachten. Adverse Effekte unter Lichtausschluss konnten nicht festgestellt werden. Zum Vergleich der Potenz verschiedener FC-Derivate wurde eine Standard-UVA-Dosis von 125 mJ/cm² festgelegt. 5-MOP war in allen Testsystemen am reaktivsten, weshalb allen anderen FCs Phototoxizitäts-, -mutagenitäts bzw. -clastogenitäts-Äquivalenzfaktoren (PTEF, PMEF, PTCF) relativ zu 5-MOP zugeordnet wurden über den Vergleich der EC_{50} -Werte und der Steigungen der Linearregressionen der Auftragung der MF bzw. der MNZ gegen die FC-Konzentration; 5-MOP wurde der Faktor 1 zugewiesen. Generell waren angulare FCs im Vergleich zu ihren linearen Strukturisomeren deutlich weniger photoreaktiv, an Pos. 8 substituierte lineare FCs waren unreaktiver als an Pos. 5 substituierte, die Einführung einer Hydroxygruppe oder Zweitsubstitution mit einer Methoxygruppe führte zum Reaktivitätsverlust.

Das Verhalten von Furocumarinen in Mischungen wurde isobolographisch am Beispiel von 5-MOP und 8-MOP untersucht. Komplexere Mischungen mit bis zu 9 verschiedenen FC-Derivaten wurden bezüglich ihres Interaktions-Index' CI auf Abweichungen von 1 untersucht und die Dosis-Wirkungsbeziehungen der theoretischen 5-MOP-Dosisäquivalente mit 5-MOP verglichen. So konnte auf Vorliegen von Dosis-Additivität geschlossen werden.

Als Ursache für die beobachteten Reaktivitätsunterschiede konnten mangelnde Absorption, geringere Interkalationsfähigkeit oder generell Wechselwirkungen mit der DNA über den Vergleich der Absorptionsspektren, hypochromen und bathochromen Effekten in Gegenwart von Kalbsthymus-DNA oder die Ethidiumbromid- und Hoechst33258-Verdrängungsassays ausgeschlossen werden. Weiterhin konnten zwei Systeme zur Bestimmung der zellfrei photochemisch gebildeten Singulett-Sauerstoff und Superoxidradikalanionen etabliert werden. Hier wurden Psoralen für die O₂^{•-}-Bildung und Riboflavin für die ¹O₂-Bildung als Positivkontrolle benutzt, wobei angulare FCs und Limettin generell stärker zur ROS-Produktion fähig waren.

Das in dieser Arbeit etablierte Äquivalenzfaktoren-Modell stellt ein gutes Instrument zur Bewertung komplexer natürlich vorkommender FC-Gemische und Abschätzung der *in vivo*-Phototoxizität über die direkt in der Haut bzw. im Blutplasma gefundene FC-Konzentration dar. Zur direkten Bewertung der oral oder dermal aufgenommenen Menge müssen allerdings weitere Faktoren wie Absorption, Metabolismus, zeitabhängige Verteilung und Exkretion, Hauttyp, Reparatur oder generell komplexere Reaktionen des Gewebes *in vivo* wie Entzündung oder Krebs berücksichtigt werden.

Abstract

Furocoumarins (FC) are secondary plant constituents synthesized i.a. by fruits and vegetables such as grapefruit or celeriac as phytoalexins. So the estimated average daily intake via food in humans is about 0.56 mg total FC in Germany, regarding acute exposures, 100-fold higher values can be reached. Their chemical structure consists of a coumarin molecule with a furan ring attached, resulting in a linear or angular structure, also various substituents can be attached: more than 90 different naturally occurring derivatives are known, varying highly in the characteristics of their properties. In combination with UVA-light, FCs and the coumarin limettin exhibit phototoxic, photomutagenic and photoclastogenic properties.

Since FCs mainly occur in mixtures of different derivatives in plants, a simple *in vitro* tool in risk assessment of naturally occurring FC mixtures was developed in this thesis using the V79 cell line. This tool regards the relative phototoxic, -mutagenic and -clastogenic potency of different FCs. Therefore diverse assays were established and optimized for photochemical applications:

The phototoxic effects were characterized and quantified via the resazurin reduction test, the quantification of the photomutagenic resp. the photoclastogenic potential was done by performing the *hprt* gene mutation assay resp. the micronucleus test. Using 5-methoxypsoralene (5-MOP) as an example, it was shown that the EC₅₀ value of the cell viability 72 h after irradiation, the increase of the mutation frequency (MF) and furthermore the increase of micronucleated cells (MNC) were dependent on the 5-MOP concentration as well as on the applied UVA-dose; in the HPRT assay and micronucleus test strictly linear relationships were found. Adverse effects under exclusion of light were not detectable. For comparison of the potency of the different FC derivatives a standard UVA dose of 125 mJ/cm² was set. 5-MOP was found to be the most reactive FC in all test systems, so to all other FCs phototoxicity, -mutagenicity and -clastogenicity equivalency factors (PTEF, PMEF, PTCF) relative to 5-MOP were assigned by comparing the EC₅₀ values and the slopes of the linear regressions of the plot MF resp. MNC vs. FC concentration; the factor 1 was assigned to 5-MOP. In general, angular FCs were less photoreactive than their linear structural isomers, linear FCs with a substitution at Pos. 8 were less reactive than the substituted ones at Pos. 5. The introduction of a hydroxy group or a second substitution with a methoxy group coincided with a loss of reactivity.

The behaviour of furocoumarins in mixtures was investigated isobolographically by using the example of 5-MOP and 8-MOP. More complex mixtures of up to 9 different FC derivatives were tested for deviations from 1 of their interaction index CI and the dose-response relationships of the theoretical 5-MOP equivalents were compared to 5-MOP. So simple similar action could be concluded.

As a reason for the observed differences in reactivity, a lacking absorption, a lesser extent of the ability to intercalate or generally to interact with DNA could be excluded by comparing the absorption spectra, hypochrome or bathochrome effects in presence of calf thymus DNA and via ethidium bromide and Hoechst33258 competition assay. Furthermore two systems for the detection of cell-free photochemically formed singlet oxygen and superoxide radical anions were established. Psoralene served as a positive control for the generation of ¹O₂, riboflavine as the one for the generation of O₂^{•-}, whereupon angular FCs and limettin were generally more capable of forming ROS.

The model of equivalency factors established within this thesis represents a suitable tool for risk assessment of complex naturally occurring FC mixtures and estimation of *in vivo* phototoxicity via the FC concentrations found directly in the skin or blood plasma. For direct risk assessment of orally consumed or dermally applied amounts of FCs, other factors such as absorption, metabolism, time-dependent distribution and excretion, skin type, repair or more complex reactions of the tissue in general such as inflammation or cancer have to be considered.

1 Einleitung

Furocumarine (FC) sind sekundäre Pflanzenmetaboliten, deren Grundgerüst aus einem Cumarinmolekül mit ankondensiertem Furanring besteht. Die Anellierung kann dabei an C⁶ und C⁷ oder C⁷ und C⁸ des Cumarins erfolgen, wodurch sie in lineare Furocumarine (Psoralene) und angulare (Angelicine) unterschieden werden (Musajo and Rodighiero 1972, Guth 2006). Über 90 natürlich vorkommende Derivate sind bisher bekannt (Scott, Pathak and Mohn 1976), die von verschiedenen Pflanzenarten als Phytoalexine als Reaktion auf Stressereignisse wie Schädlinge oder mikrobiellen Befall gebildet werden, wodurch die FC-Gehalte in der Pflanze stark ansteigen können (Ostertag et al. 2002). Bei diesen Pflanzen handelt es sich u. a. um Doldenblütler (*Apiaceae*) wie Pastinaken (*Pastinaca sativa*), Sellerie (*Apium graveolens*) und Angelika (*Angelica archangelica*) oder Rautengewächse (*Rutaceae*), zu denen auch Zitrusfrüchte wie Limette (*Citrus aurantiifolia*) und Grapefruit (*Citrus paradisi*) gehören, und die als Lebensmittel, aber auch als Getränkezusätze und pflanzliche Medikamente Verwendung finden (Hiller and Melzig 2006, SKLM 2006). Abgeschätzt wurde daher die durchschnittliche tägliche Gesamt-Furocumarin-Aufnahme pro Person auf 1,3 mg in den USA (Wagstaff 1991), 1,2 mg in Großbritannien (COT 1996) und noch 2004 auf 1,45 mg in Deutschland (SKLM 2006). Letzterer Wert wurde jedoch 2010 auf 0,56 mg korrigiert, da in mit Zitrusölen aromatisierte Getränke, die bisher als Hauptexpositionsquelle vermutet wurden, in 17 von 18 Fällen keine der untersuchten Furocumarine nachgewiesen werden konnten (Gorgus et al. 2010, SKLM 2010). Durch den Verzehr mikrobiell infizierter Pflanzen, z.B. 200 g Pastinake, können allerdings Akutexpositionen von 45-100 mg erreicht werden (Ljunggren 1990, SKLM 2006). Generell ist die Aufnahme von Furocumarinen daher stark abhängig von persönlichen Präferenzen und der Lebensmittelqualität und kann daher erheblich interindividuell und zeitabhängig variieren.

In Kombination mit UVA-Strahlung (315-400 nm) besitzen Furocumarine, ebenso wie Limettin (Ashwood-Smith, Poulton and Liu 1983), nicht nur *in vitro* ein phototoxisches (Ashwood-Smith et al. 1980, Musajo and Rodighiero 1972), mutagenes und clastogenes Potential. So wurde das Auftreten von Mutationen in verschiedenen Zell- und Testsystemen beschrieben, z.B. in *E. coli*, V79-Zellen und CHO-Zellen (Loveday and Donahue 1984, Tamaro et al. 1986), ebenso wie das Auftreten von Mikrokernen, z.B. in V79-Zellen (Kersten et al. 1999). Weiterhin können nach systemischer und dermaler Applikation an Labortieren und Menschen phototoxische Hautreaktionen wie Erytheme oder Ödeme auftreten (Austad and Kavli 1983, Ljunggren 1990, Musajo and Rodighiero 1972). In Follow-Up-Studien zur PUVA-Therapie (Psoralen + UVA, Photochemotherapie) wurde ein erhöhtes Auftreten von Basalzellkarzinomen festgestellt, weshalb einige Derivate (8- und 5-Methoxypsoralen, 8-MOP und 5-MOP) als Humankarzinogene der Klasse 1 bzw. 2A eingestuft wurden (IARC 1980, IARC 1986).

Als Hauptursache für diese in biologischen Systemen beobachteten Effekte wird die photochemisch induzierte kovalente Bindung von FC an die DNA diskutiert: Zunächst interkaliert das Furocumarinmolekül zwischen die Basen der DNA, wo es nach der Absorption eines Photons geeigneter Wellenlänge ($\lambda \approx 365$ nm) entweder über die Doppelbindung des Pyron- oder des Furanrings in einer [2+2]-Cycloaddition kovalent

Pyrimidinbasen bindet, dabei bevorzugt an Thymin in A/T-reichen Sequenzen. Nach Absorption eines zweiten Photons können Furanaddukte linearer Furocumarine eine zweite Cycloaddition über die Pyron-Doppelbindung mit einer gegenüberliegenden Pyrimidinbase eingehen und so die komplementären DNA-Stränge quervernetzen. Pyron-Monoaddukten und angularen Furocumarinen, ebenso Limettin, fehlt die Fähigkeit zur Crosslinkbildung (Kitamura, Kohtani and Nakagaki 2005, Bordin, Dall'Acqua and Guiotto 1991, Saenz-Méndez et al. 2007). Durch unzureichende Reparatur solcher Basenmodifikationen können Mutationen oder durch Chromosomenbrüche verursachte Mikrokerne die Folge sein. Weiterhin können die Bindung von FCs an zelluläre Komponenten wie Proteinen und Lipiden (Beijersbergen van Henegouwen et al. 1989, Potapenko 1991) oder die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Bordin et al. 1991, Joshi and Pathak 1983) zu den adversen Effekten beitragen. Zudem sind Furocumarine wie 6',7'-Dihydroxybergamottin ohne Lichteinfluss potente Inhibitoren bzw. Modulatoren des Fremdstoffmetabolismus (Tassaneeyakul et al. 2000).

Bezüglich ihrer Photoreaktivität weisen die einzelnen Furocumarinderivate große Unterschiede auf. So sind angular Furocumarine i.A. weniger reaktiv als lineare, auch die Art und Position der Substituenten trägt zur Erhöhung oder auch völligen Eliminierung der Reaktivität bei (Musajo and Rodighiero 1972). Dennoch werden üblicherweise z.B. bei Bewertungen von Furocumarinen nur die Gesamt-Furocumarin-Gehalte in der Pflanze oder in deren Zubereitung angegeben und diese wie eine einzelne Substanz analog zu einem FC mit bekannter Phototoxizität wie 8-MOP bewertet (SKLM 2006), auch wenn Furocumarine in Pflanzen meist in Mischungen vorkommen, deren Komponenten über eine stark unterschiedliche Reaktivität verfügen. Auch werden FC-haltige Pflanzenextrakte wie Bergamottöl oft nur als Extrakt untersucht ohne vollständige Isolation und Testung aller photochemisch aktiven Komponenten (Averbeck et al. 1990, Zaynoun, Johnson and Frain-Bell 1977). Daher sind Daten zur genauen phototoxischen Potenz einer Furocumarinmischung selten vorhanden, auch mögliche Wechselwirkungen der Komponenten untereinander sind kaum charakterisiert und somit Abweichungen von einem zunächst anzunehmenden dosisadditiven Verhalten kaum ermittelbar. Zwar konnten z.B. Schlatter et al. (1991) an humanen Probanden eine additive Wirkung der Phototoxizität von 5-MOP und 8-MOP zeigen und dieser Mischung eine 8-MOP-Äquivalenzdosis zuordnen; ein einheitliches Konzept zur Berechnung bzw. Abschätzung der phototoxischen und photogentoxischen Potenz natürlich vorkommender Furocumarinmischungen, das möglichst viele Derivate berücksichtigen kann, ist derzeit allerdings nicht verfügbar.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Risikobewertung

Der Begriff Risiko lässt sich nach folgender Formel beschreiben:

$$\text{Risiko} = \text{Exposition} \times \text{Gefährdungspotential}$$

Somit ist das Risiko eines bestimmten Stoffes für den Menschen (oder ein anderes biologisches System) definiert als das Produkt aus seinem stoffintrinsischen, nicht modifizierbaren Gefährdungspotential und der nicht stoffintrinsischen, modifizierbaren Exposition gegenüber diesem Stoff. Generell lässt sich das Vorgehen zur Risikobewertung und weitere Schritte nach folgendem Schema darstellen (Abb. 2.1):

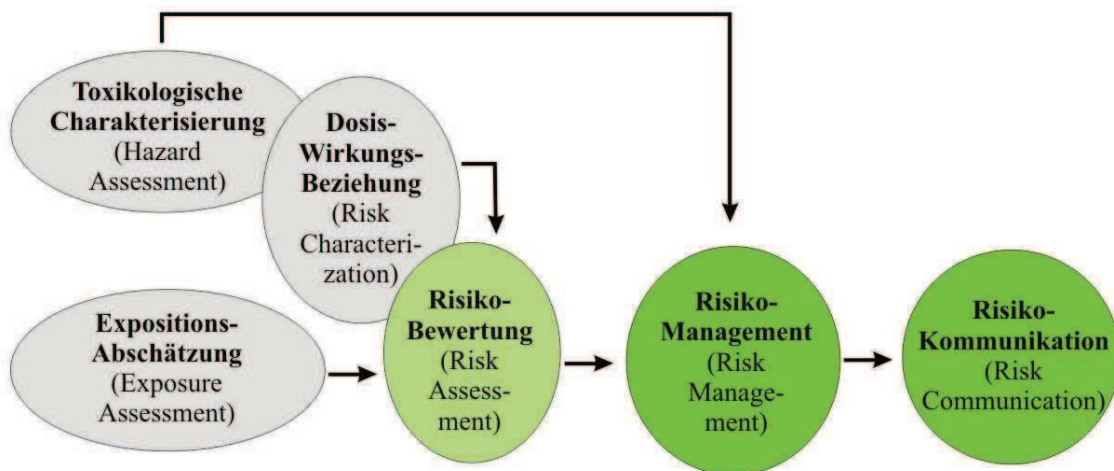


Abb. 2.1: Risikobewertung und -Management nach (Marquardt and Schäfer 2004)

Das gesamte Vorgehen kann in folgende Schritte unterteilt werden:

1. Toxikologische Charakterisierung (Hazard Assessment): Identifikation eines biologischen, chemischen oder physikalischen Agens oder Stoffgemisches, dem der Mensch exponiert sein könnte, mit Vorschlägen zur Einstufung und Kennzeichnung.
2. Dosis-Wirkungs-Beziehung (Risk Characterization): Nähere, qualitative und/oder quantitative Beurteilung der Art der Gesundheitsschädigung durch das biologische, chemische oder physikalische Agens über die Erfassung der Dosis-Wirkungs-Beziehung des jeweiligen toxikologischen Endpunkts. Hierbei können gesundheitlich relevante Grenzen abgeleitet werden.
3. Expositions-Abschätzung (Exposure Assessment): Qualitative und/oder quantitative Beurteilung der wahrscheinlichen Aufnahme des biologischen, chemischen oder physikalischen Agens zu berücksichtigen sind dabei Umweltexposition, Aufnahme über die Nahrung oder Arbeitsplatzexposition.
4. Risikobewertung (Risk Assessment): Qualitative und/oder quantitative Einschätzung der Eintrittswahrscheinlichkeit und Schwere der bekannten oder potentiellen adversen Effekten auf die Gesundheit der Bevölkerung oder bestimmter Bevölkerungsgruppen auf Grundlage von 1.-3. unter Berücksichtigung der mit der Bewertung verbundenen Unsicherheiten.

5. Risikomanagement (Risk Management): Bewertung und Vorschlag sämtlicher Maßnahmen, die die Erzielung eines angemessenen Schutzniveaus ermöglichen.

6. Risikokommunikation (Risk Communication): Informationsaustausch mit allen Betroffenen (Entscheidungsträger, Kontrolleure, Verbraucher, Erzeuger), um die Gründe für eine vorgeschlagene Maßnahme zu erklären und zu rechtfertigen.

Zur erfolgreichen Bewertung von Chemikalien muss zunächst eine ausreichende Datenlage geschaffen werden, die gesetzlich festgelegt ist und deren Testumfang je nach Größe der jährlichen Tonnage (Staffelung nach REACH: 1 t/a, 100 t/a, 1000 t/a) und Verwendungszweck (Chemikalien allgemein, Arzneimittel, Pestizide) unterschiedlich sein kann. Zu diesen Tests gehören z.B. physikalisch-chemische Eigenschaften, Prüfung auf akute, subchronische und chronische Toxizität, Mutagenität, Kanzerogenität, Hautsensibilisierung oder Reproduktionstoxizität. Aus diesen Daten können nun gesundheitlich relevante Grenzen vom NOAEL (no observed adverse effect level), falls vorhanden, abgeleitet werden wie

- ADI: „Acceptable Daily Intake“ (akzeptable tägliche Aufnahme)
- ARfD: „Acute Reference Dose“ (akute Referenzdosis)
- AOEL: „Acceptable Operator Exposure Level“ (akzeptable Anwenderexposition)
- TDI: „Tolerable Daily Intake“ (duldbare tägliche Aufnahme).

Dies geschieht unter Einbezug von Sicherheits-Faktoren (SF) für Unsicherheiten wie

- Inter-Spezies-Variabilität (SF=10; 2,5 für toxikodynamische, 4,0 für toxikokinetische Unterschiede)
- Intra-Spezies-Variabilität (SF=10; 3,2 für toxikodynamische, 3,2 für toxikokinetische Unterschiede)
- Datenqualität (SF=1-10)
- Extrapolation von LOAEL (lowest observed adverse effect level) auf NOAEL (SF=1-10)

Alternativ zu festgelegten Grenzwerten nicht-kanzerogener Stoffe kann ein Risiko über den Margin of Safety (MOS) abgeschätzt werden, der den Abstand zwischen NOAEL und tatsächlicher Exposition beschreibt.

Kanzerogene Stoffe, zu denen auch Furocumarine gehören, werden nicht nach dieser Vorgehensweise bewertet: Hier gilt prinzipiell das strikte Minimierungsgebot ALARA (as low as reasonably achievable). Dennoch können hier über das MOS-Analogon MOE (Margin of Exposure), der vom BMDL (Benchmark Dose Lower Confidence Limit, 10% Tumorinzidenz im Tierversuch) abgeleitet wird, wenn dieser sehr groß ist (>10000), oder die in den USA verbreitete Virtually Safety Dose (ein zusätzlicher Krebsfall pro 10^5 - 10^7 Menschen) „sichere“ Expositionen, genauer gesellschaftlich tolerierte Risiken, abgeschätzt werden.

Dies ist insofern legitim, da die allgemein akzeptierten linearen Extrapolationen von den hohen Dosen im Tierversuch für gentoxische Substanzen nicht die körpereigenen Reparaturmechanismen (vgl. 2.4.2.2) oder sonstige chemische Detoxifizierungen berücksichtigen und weiterhin für nicht-gentoxische Kanzerogene ohnehin eine Schwellendosis gezeigt werden konnte (BfR 2007, Choudhury et al. 2000, Marquardt and Schäfer 2004, Wolf 2006, Eisenbrand and Schreier 2006, REACH-VO 2006, Reichl and Schwenk 2004, Henderson, Albertini and Aardema 2000, Jenkins et al. 2005, BfR 2005, Kirsch-Volders, Aardema and Elhajouji 2000).

2.2 Mischungen chemischer Stoffe

Mischungen chemischer Stoffe sind ubiquitär am Leben beteiligt, sei es in physiologischen Prozessen oder Exposition im täglichen Leben, sei es simultan oder sequenziell; die Exposition gegenüber Reinsubstanzen ist eher die Ausnahme als die Regel. Als Beispiele können Pestizide oder Arzneimittelkombinationen als einfache Mischungen mit bekannter Zusammensetzung oder Lebensmittel, Trinkwasser, Atemluft oder Tabakrauch als komplexe Mischungen genannt werden. Dennoch werden in der Toxikologie immer noch über 95% der Ressourcen auf Studien an Reinsubstanzen verwendet ohne Berücksichtigung möglicher Kombinationswirkungen. Im Folgenden soll daher auf verschiedene Möglichkeiten der Kombinationswirkung eingegangen werden, experimentelle Ansätze zu deren Erfassung erläutert und Konzepte zur Risikoerfassung dargelegt werden (Cassee et al. 1998, Feron, Cassee and Groten 1998, Marquardt and Schäfer 2004, el-Masri et al. 1995, Groten, Feron and Suhnel 2001).

2.2.1 Konzepte der kombinierten Wirkung chemischer Stoffe

Weisen die Komponenten einer Mischung unterschiedliche Wirkmechanismen auf, die sich gegenseitig nicht beeinflussen, können diese individuell untersucht werden. Zeigen jedoch zwei oder mehr Substanzen gleiche Wirkmechanismen, spricht man von additiver Kombinationswirkung, wenn die Einzelsubstanzen nicht miteinander wechselwirken, und von antagonistischer bzw. synergistischer Kombinationswirkung, wenn eine Wechselwirkung stattfindet und die Kombinationseffekte kleiner bzw. größer sind, als bei reiner Additivität zu erwarten wäre. Zur Kombinationswirkung wurden folgende drei Konzepte definiert (Cassee et al. 1998, Groten et al. 2001, Marquardt and Schäfer 2004):

Dosis-Additivität

Das Konzept der Dosis-Additivität ist auch bekannt unter „einfach ähnlicher Wirkung“ (simple similar action) oder „einfach gemeinsamer Wirkung“ (simple joint action) und folgt der Annahme, dass alle Substanzen wechselwirkungsfrei nach dem gleichen Mechanismus wirken und sich nur in ihrer Potenz und somit Dosis-Wirkungsbeziehung unterscheiden. Somit kann der zu erwartende Gesamteffekt aller Einzelkomponenten einer Mischung als die Summe der relativen Dosen der Reinsubstanzen unter Berücksichtigung deren relativer Potenz dargestellt werden gemäß:

$$\sum_{i=1}^n d_i / D_i = 1$$

Mit: d_i = Kombinationsdosen der Substanzen 1 bis n, die in der Mischung zu einem bestimmten Gesamteffekt führen

D_i = Dosen der Substanzen 1 bis n, die den gleichen Effekt wie die Mischung zeigen

Dies stellt die Basis dar für das Konzept der toxischen Äquivalenzfaktoren (Toxicity Equivalency Factors, TEF), wie es zur Charakterisierung der kombinierten Wirkung von Dioxinen und Dioxin-artigen polychlorierten Biphenylen (PCBs) verwendet wird, oder des Hazard Index (HI) (vgl. 2.2.3). Diese Gleichung kann direkt mit der Dosis-Wirkungs-

Beziehung kombiniert werden, wie am Beispiel einer Exponentialgleichung gezeigt, unter der Voraussetzung, dass der Exponent μ für alle Substanzen einer Mischung gleich ist.

$$E_0^{1-n}(d_{1-n}) = \left(\sum_{i=1}^n d_i / \alpha_i \right)^\mu$$

Mit: E_0^{1-n} = Kombinationseffekt der Substanzen 1 bis n

d_i = Kombinationsdosen der Substanzen 1 bis n, die in der Mischung zu einem bestimmten Gesamteffekt führen

α, μ = Parameter

Diese Gleichung beschreibt eine Dosis-Wirkungsfläche für Mischungen, die eine Dosis-Additivität zeigen, und gilt für beliebige Dosen, Effekte und Parameter (Berenbaum 1985, Groten et al. 2001, Marquardt and Schäfer 2004, Choudhury et al. 2000, Safe 1998, Teuschler and Hertzberg 1995).

Wirkungs- bzw. Effekt-Additivität

Synonyme für dieses Konzept sind „einfach unähnliche Wirkung“ (simple dissimilar action), „einfach unabhängige Wirkung“ (simple independent action) oder „einfach gemeinsame Wirkung“ (simple joint action), wobei letzteres auch zu Verwechslungen mit der Dosis-Additivität führen kann. Die Einzelkomponenten einer Mischung beeinflussen hierbei nicht die toxischen Effekte der anderen, können sich allerdings auch in ihren Wirkmechanismen und Angriffspunkten, z.B. Rezeptorbindungsstellen, unterscheiden.

Prinzipiell können nur Kombinationseffekte gleicher Einzeleffekte ermittelt werden, wobei die spezifische Definition von Effekten sehr variabel sein kann. So kann z.B. der Effekt als Tumorbildung definiert werden, wenn Substanz 1 Lebertumoren, Substanz 2 Nierentumoren induziert, oder allgemeiner als überlebende Versuchstiere, wenn die Population simultan z.B. Kanzerogenen und Viren ausgesetzt ist. Generell wird das Konzept der Effekt-Additivität eingesetzt, wenn die Individuen einer Population eine gewisse Toleranz gegenüber den Komponenten einer Mischung zeigen und erst Effekte auftreten, wenn die Toleranzschwelle überschritten ist. Daher wird eher die Zahl der ansprechenden Individuen als der durchschnittliche Effekt einer Mischung angegeben.

Angegeben wird der Kombinationseffekt E_0^{1-n} als Summe der Einzeleffekte:

$$E_0^{1-n}(d_{1-n}) = \sum_{i=1}^n E^i(d_i)$$

Mit: E_0^{1-n} = Kombinationseffekt der Substanzen 1 bis n

E^i = Einzeleffekte der Substanzen 1 bis n, ausgelöst durch d_i

d_i = Kombinationsdosen d. Substanzen 1 bis n, die in der Mischung zu einem bestimmten Gesamteffekt führen

Dieses Konzept kann auch als absolute Effekt-Additivität bezeichnet werden; weiterhin gibt es noch die relative Effekt-Additivität, auch Unabhängigkeits-Kriterium genannt, die zur Beschreibung von Relativ-Effekten zwischen 0% und 100% benutzt wird und davon ausgeht, dass ein Individuum nicht gleichzeitig auf Substanz 1 und 2 reagieren kann. Dies bedeutet an einem Beispiel, dass der Tod eines Versuchstiers einer Gruppe entweder durch einen Leber- oder einen Nierentumor verursacht wird, oder anders ausgedrückt, der Tod durch einen Nierentumor wird von dem Tod durch einen Lebertumor „verhindert“ und umgekehrt. Nach dem Unabhängigkeits-Kriterium ergibt sich der Kombinationseffekt aus zwei Einzeleffekten nach:

$$E_0^{1,2}(d_1, d_2) = E^1(d_1) + E^2(d_2) \cdot (1 - E^1(d_1)) = E^1(d_1) + E^2(d_2) - E^1(d_1) \cdot E^2(d_2)$$

Mit: $E_0^{1,2}$ = Kombinationseffekt der Substanzen 1 und 2

E^1, E^2 = Einzeleffekte der Substanzen 1 und 2, ausgelöst durch d

d_1, d_2 = Kombinationsdosen der Substanzen 1 und 2, die in der Mischung zu einem bestimmten Gesamteffekt führen

In der Regel ergeben sich durch die unterschiedlichen Kriterien ausgehend von den gleichen Einzeleffekten unterschiedliche Kombinationseffekte; in Spezialfällen ergeben sich aber auch gleiche Resultate: Für lineare Dosis-Wirkungs-Beziehungen liefern Dosis- und Effekt-Additivität gleiche Resultate, für exponentielle Dosis-Additivität und relative Effekt-Additivität zeigen sich ebenfalls gleiche Kombinationseffekte (Cassee et al. 1998, Marquardt and Schäfer 2004, Teuschler and Hertzberg 1995, Konemann 1981).

Wechselwirkung

Die Komponenten einer Mischung können miteinander interagieren und so die Stärke oder manchmal auch Art des Effekts der anderen Substanz modifizieren und so den nach dem Additivitätskriterium erwarteten Kombinationseffekt verstärken oder abschwächen. Der Begriff „Wechselwirkung“ bedeutet dabei „Abweichung von der Additivität“ und meint nicht Wechselwirkung im physiologischen Sinn; ist der Kombinationseffekt stärker als erwartet, spricht man von Synergismus, Potenzierung oder Supra-Additivität, ist er schwächer, von Antagonismus, Sub-Additivität, Infra-Additivität oder Inhibierung. Dabei kann der zugrunde liegende Mechanismus physikochemischer und/oder biologischer Natur sein, die Wechselwirkung toxikokinetischer (Aufnahme, Verteilung, Metabolismus, Ausscheidung) oder toxikodynamischer Natur (Effekte auf Rezeptor, Target in der Zelle oder Organ). Ein Beispiel toxikokinetischer Natur ist die Enzym-Induktion und/oder -Inhibition, da die Beeinflussung der Enzymaktivität durch Substanz 1 die Toxifizierung oder Detoxifizierung von Substanz 2 beeinflussen kann. Ein weiteres Beispiel ist der sog. „Kompetitive Agonismus“, bei der zwei einer Michaelis-Menten-Kinetik unterworfenen Substanzen um die gleiche Rezeptor-Bindungsstelle konkurrieren und der Kombinationseffekt geringer als der erwartete Effekt ist; dies kann allerdings auch als Spezialfall der Dosis-Additivität gesehen werden.

In der Realität ist allerdings kaum zu erwarten, dass sich eine Mischung strikt nach einem der drei Konzepte beschreiben lässt, sondern eher mit einer Kombination daraus, vor allem, wenn die Mischung und ihre Targets komplexerer Natur sind (Cassee et al. 1998, Groten et al. 2001, Marquardt and Schäfer 2004, Choudhury et al. 2000).

2.2.2 Experimentelle Ansätze

Zur Charakterisierung des Kombinationseffekts einer Mischung verglichen mit den Effekten der Einzelkomponenten gibt es einige Ansätze. Idealerweise sollten alle Komponenten identifiziert und getestet werden. Zur Aufwandsminimierung sind verschiedene Ansätze denkbar, abhängig von der Zahl der Einzelkomponenten oder ob mögliche Wechselwirkungen identifiziert werden sollen.

Komplette Mischungen

Der pragmatischste Weg, den Gesamteffekt einer Mischung zu untersuchen, ist das Testen der gesamten Mischung und der n Einzelkomponenten vergleichbarer Dosierung bei nur einer Dosis. Dies erfordert nur eine minimale Anzahl von Testgruppen ($n+1$), liefert aber keinerlei Hinweise auf Dosis-Wirkungsbeziehungen, Wechselwirkungseffekte oder die Möglichkeit zur Niedrigdosis-Extrapolation. Diese Methode wird häufig als erstes Screening-Verfahren verwendet, zur Testung nicht ausreichend charakterisierter Mischungen, aber auch zur Testung des Kombinationseffekts definierter Mischungen beispielsweise aus Pestiziden oder Kanzerogenen (Cassee et al. 1998, Groten et al. 2001, Marquardt and Schäfer 2004).

Wechselwirkungseffekte in Mischungen einer kleinen Anzahl von Stoffen

Die Identifizierung von Wechselwirkungseffekten in einer Mischung mit zwei oder drei Komponenten kann über eine toxikokinetische Modellierung mit physiologischen Modellen, eine Dosis-Wirkungsflächenanalyse oder eine isobolographische Analyse erfolgen.

Erstere Variante ist besonders für Wechselwirkungen in der toxikokinetischen Phase geeignet. Prinzipiell werden hier für die Vorhersage z.B. des menschlichen Metabolismus *in vitro*-Enzym-Kinetiken verwendet und mit *in vivo* und *in vitro*-Daten aus Tierversuchen abgeglichen. Zusätzlich kann hier z.B. mit einfließen, wie der Effekt der wirksamsten Substanz einer Mischung von den anderen Komponenten beeinflusst wird. In der Praxis sind solche Daten aber nicht immer verfügbar, die Toxifizierung der Einzelsubstanzen kann trotz ähnlicher Biotransformationswege unterschiedlich sein, weswegen das Risiko für den Menschen unter Verwendung frei gewählter Sicherheitsfaktoren extrapoliert wird.

Bei der Dosis-Wirkungsflächenanalyse und der isobolographischen Analyse handelt es sich um mathematische Modelle, die besonders geeignet sind für Mischungen, deren Einzelkomponenten das gleiche Target haben und die Wechselwirkung so in der toxikodynamischen Phase stattfindet. Mit Hilfe der Dosis-Wirkungsflächenanalyse können für Dosis-Additivität, absolute und relative Effekt-Additivität auf statistischer Basis Dosis-Wirkungsflächen generiert werden, diese mit experimentellen Daten verglichen und so ermittelt werden, ob diese auf den Wirkungsflächen liegen und damit keine Wechselwirkungen stattfinden oder ob sie statistisch signifikant abweichen und damit synergistische oder antagonistische Wechselwirkungen bestehen. Alternativ kann eine Wirkungsfläche an experimentelle Daten gefittet werden und darüber die dazugehörigen Wechselwirkungsparameter bestimmt werden.

Die isobolographische Methode ist eine einfache, graphische, aber arbeitsaufwändige Methode, um zu ermitteln, ob eine Mischung zweier Reinstoffe dem Dosis-Additivitäts-Kriterium folgt. Dazu wird die Dosis von Substanz A (d_A), die zusammen mit einer Dosis von Substanz B den gleichen Effekt ergibt, als Funktion der Dosis von B (d_B) dargestellt (vgl. Abb. 2.2.2), woraus sich eine Konturlinie, eine sogenannte Isobole, ergibt, auf der alle äqui-effektiven Dosis-Kombinationen der Stoffe A und B liegen. Verhalten sich die beiden Reinstoffe in der Mischung strikt additiv und bleibt das Verhältnis ihrer relativen Potenzen über den betrachteten Dosisbereich konstant, liegen alle äqui-effektiven Kombinationen auf einer Geraden (Iso-Effekt-Linie) zwischen den Dosen der beiden Einzelstoffe (D_A , D_B), die den gleichen Effekt erzeugen. Bei Abweichungen von der Linearität entspricht eine konkave Linie antagonistischen, eine konvexe synergistischen Wechselwirkungseffekten. Dieses Modell kann nur für Stoffe angewendet werden, deren

Dosis-Wirkungs-Kurven entweder identisch sind oder einfache Lineartransformationen voneinander sind.

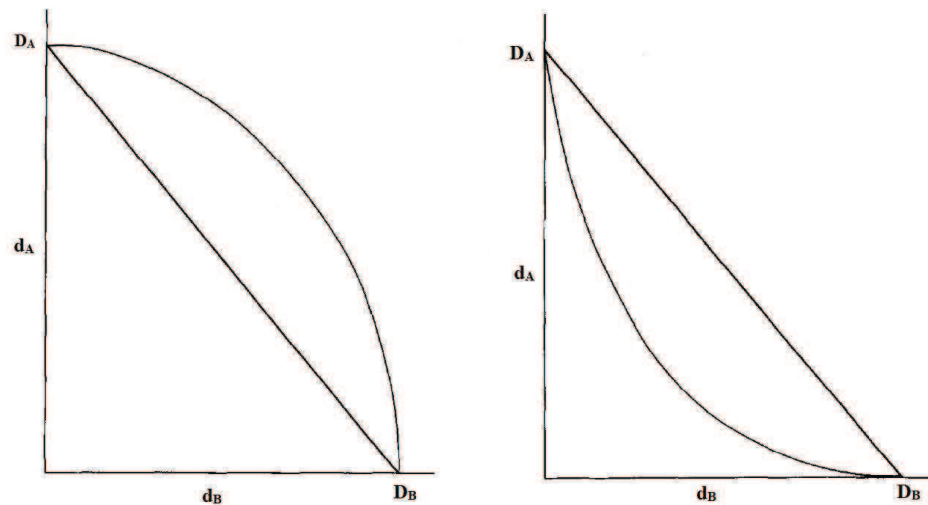


Abb. 2.2.2: Isobologramme der Mischungen zweier Reinstoffe A&B mit antagonistischen (links) und synergistischen (rechts) Effekten. Die Geraden repräsentieren das Verhalten bei Additivität, nach (Carter 1995), mit d_A, d_B =relative Dosen von A&B in der Mischung und D_A, D_B =Dosen von A&B, die die gleichen Effekte wie die Mischung ergeben

Verallgemeinert und mathematisch beschrieben werden kann diese Methode nach Berenbaum (1981) über den Interaktions-Index CI in Analogie zur Dosis-Additivität:

$$CI = \sum_{i=1}^n d_i / D_i$$

Mit: CI = Interaktions-Index

d_i = Kombinationsdosen der Substanzen 1 bis n, die in der Mischung zu einem bestimmten Gesamteffekt führen

D_i = Dosen der Substanzen 1 bis n, die den gleichen Effekt wie die Mischung zeigen

Diese Gleichung beschreibt eine (n-1)-dimensionale Hyperebene und stellt die Verallgemeinerung der in Abb. 2.2.2 gezeigten Isobologramme für Mischungen mit n Komponenten dar. Ist der CI gleich, größer oder kleiner 1, entspricht dies keiner Interaktion, Antagonismus oder Synergismus (Groten et al. 2001, Cassee et al. 1998, Marquardt and Schäfer 2004, Carter 1995, Bosgra, van Eijkeren and Slob 2009, Berenbaum 1981, Tallarida 2006).

Wechselwirkungseffekte in Mischungen einer großen Anzahl von Stoffen

Besteht eine Mischung aus mehr als zwei Komponenten, muss mit Zweistoff- und Dreistoff-Wechselwirkungen gerechnet werden. Sollen alle diese Effekte geprüft werden, nimmt die Zahl der Versuche exponentiell zu. Für komplexe Mischungen wie Abgase, Tabakrauch oder Lebensmittel, die aus Tausenden von Stoffen bestehen können, welche auch nicht alle bekannt sind, ist eine derartige Testung nicht möglich. Daher werden für die Testung und Bewertung der u.a. in komplexen Mischungen wie Lebensmitteln vorkommenden Furocumarine die unter 2.2.3 beschriebenen Ansätze verfolgt (Cassee et al. 1998, Groten et al. 2001, Marquardt and Schäfer 2004).

2.2.3 Risikobewertung von Mischungen chemischer Stoffe

Für die Risikobewertung von Mischungen chemischer Stoffe sind die unter 2.1 beschriebenen allgemeinen Prinzipien der Risikobewertung ebenso gültig. Dabei kann das von Groten (2001) vorgeschlagene Modell zur Aufschlüsselung und detaillierten Betrachtung herangezogen werden. Eine allgemeingültige Richtlinie für die Testung und Bewertung von Mischungen kann aufgrund von Mischungs- und Stoffvariabilitäten nicht vorgeschlagen werden (Abb. 2.2.3a).

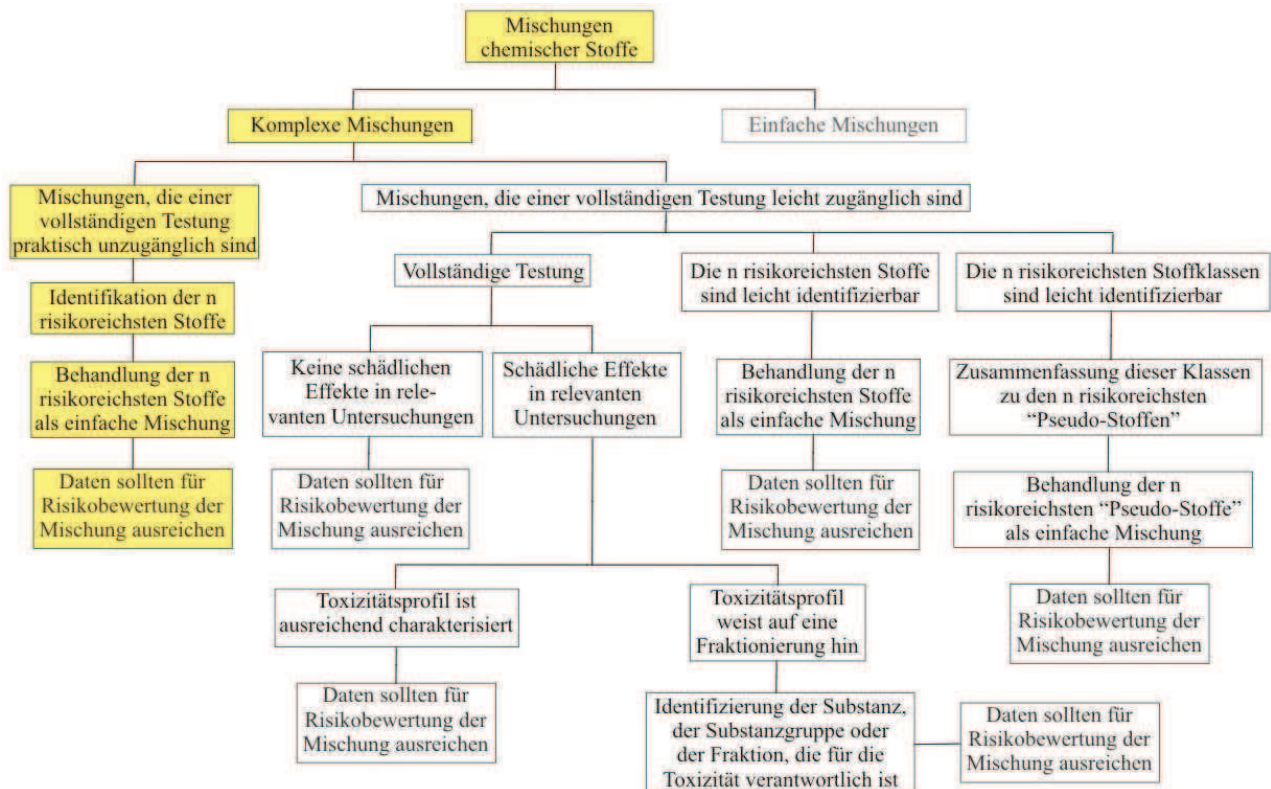


Abb. 2.2.3a: Schematische Darstellung der Bewertung komplexer Mischungen nach (Groten et al. 2001, Marquardt and Schäfer 2004)

Die in dieser Dissertation verfolgte Vorgehensweise ist gelb unterlegt. Kann dabei die komplexe Mischung (deutlich mehr als 10 Komponenten, qualitativ und quantitativ nicht vollständig bekannt, z.B. natürlicher Aromastoff-Komplex) auf eine einfache Mischung (10 oder weniger Komponenten, qualitativ und quantitativ bekannt, z.B. Pestizid-Cocktail) reduziert werden, wird weiter nach Abb. 2.2.3b verfahren:

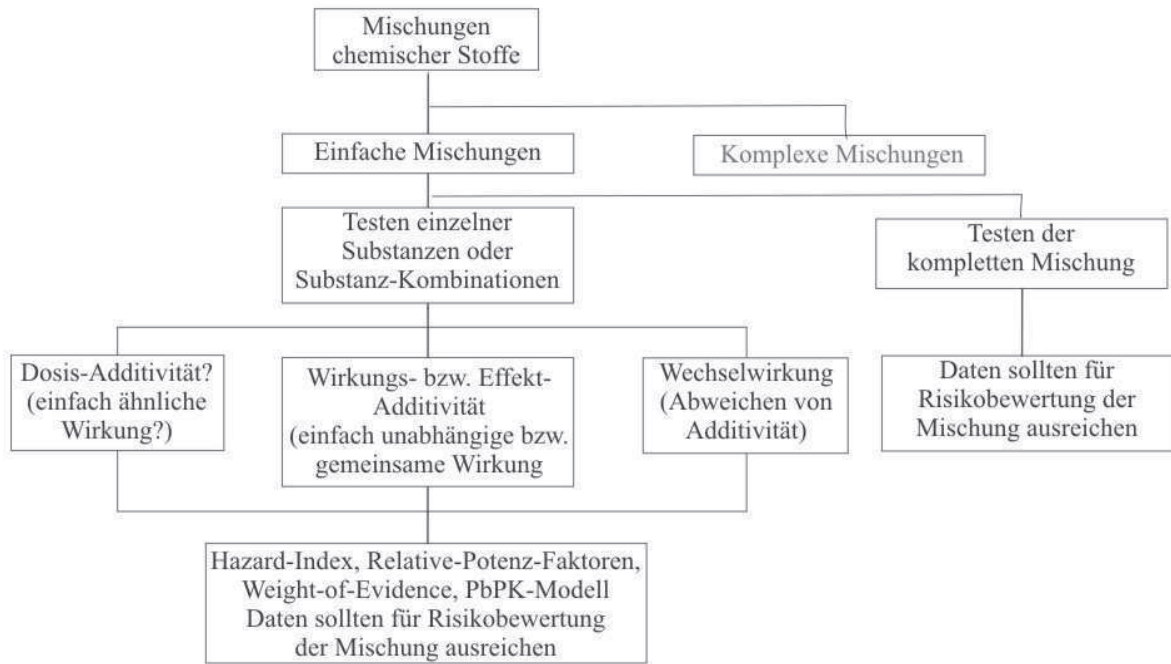


Abb. 2.2.3b: Schematische Darstellung der Bewertung einfacher Mischungen nach (Groten et al. 2001), mit PbPK = Physiologisch-basierte pharmakokinetische Modellierung

Zu unterscheiden sind hier zwei Herangehensweisen: Erstens der „top-down approach“, bei der die gesamte Mischung analysiert wird ohne Berücksichtigung möglicher Wechselwirkungen, was häufig für komplexe Mischungen angewandt wird. Zweitens der „bottom-up approach“, bei dem die Einzelkomponenten einer Mischung getestet werden und so mögliche Wechselwirkungen detektiert werden können. Im Rahmen dieser Dissertation wird die Charakterisierung der Einzelkomponenten vorgenommen, da Furocumarine bezüglich ihrer Phototoxizität das größte Gefährdungspotential aufweisen und so die gewonnenen Erkenntnisse auf viele Pflanzen und Zubereitungen anwendbar sind.

In der Empfehlung des BfR (2008) am Beispiel von Pflanzenschutzmitteln wird folgende Vorgehensweise empfohlen:

- Stoffe mit unterschiedlichem Wirkmechanismus wirken unabhängig voneinander und zeigen keine Additivität oder Potenzierung der Effekte, wenn die Dosen der einzelnen Stoffe unterhalb des jeweiligen NOAEL liegen. Sie werden als Einzelstoffe bewertet.
- Stoffe mit gleichem Wirkmechanismus werden, auch wenn dies in der Realität eher die Ausnahme als die Regel ist, über das Dosis-Additivitäts-Modell bewertet, was von sehr niedrigen Dosen bis zum NOAEL verwendet werden kann und die verbreitetste Methode zur Risikoabschätzung darstellt. Nach einem Vorschlag der US EPA (1986) sollte dafür der Hazardindex HI_{add} für additive Mischungen benutzt werden:

$$HI_{add} = \sum_{i=1}^n D_i / RfD_i$$

Mit: HI_{add} = Hazard Index für additive Mischungen

D_i = Expositionsdosen der Substanzen 1 bis n

RfD_i = Referenzdosen der Substanzen 1 bis n (festgelegter Grenzwert)

Da beim HI_{add} mögliche Wechselwirkungen nicht berücksichtigt werden, kann zusätzlich für binäre Mischungen eine Weight-of-Evidence-Klassifizierung eingeführt werden, die

den HI_{add} um einen Unsicherheitsfaktor UF^{WOE} ergänzen, der aus entsprechenden Versuchsdaten abgeleitet wurde.

Weitere Möglichkeiten zur Beurteilung von Stoffen mit ähnlicher toxischer Wirkung sind:

- Toxicity Equivalency Factors (TEF): Die Potenz ähnlich wirkender Stoffe wird über Einführung eines Äquivalenzfaktors auf die Potenz eines „Index-Stoffes“ normiert, dem also der Faktor 1 zugeordnet wird, um eine Äquivalenz-Exposition abschätzen zu können. Die Exposition wird dann als Toxizitäts-Äquivalente (bzw. Toxicity Equivalents), sog. TEQ, ausgedrückt, die sich wie folgt berechnen:

$$TEQ_{gesamt} = \sum_{i=1}^n D_i \times TEF_i$$

Mit: TEQ_{gesamt} = Gesamt-Toxizitäts-Äquivalente aller Komponenten der Mischung

D_i = Dosen der Substanzen 1 bis n

TEF_i = Toxizitäts-Äquivalenz-Faktoren d. Substanzen 1 bis n

Dieser Ansatz wurde ursprünglich von der US EPA eingeführt, um die potentielle Toxizität einer Mischung strukturell verwandter polychlorierter Dibenzo-*p*-dioxine, Dibenzofurane und Biphenyle, normiert auf den toxischsten Vertreter TCDD, abschätzen zu können, wird aber aktuell auch z.B. vom BfR oder der US EPA diskutiert, um Mehrfachrückstände von Pflanzenschutzmitteln als sog. Cumulative Assessment Groups (CAG) zu bewerten. Bei diesem Konzept handelt es sich nach dem BfR (2008) gegenüber dem HI um eine komplexere und verfeinerte Methode, weshalb sie in dieser Arbeit bevorzugt angewendet wird.

- Combined Margins of Exposure (MOE_T): Vgl. 2.1, Addition erfolgt reziprok.

- Point of Departure Index (PODI)

- Cumulative Risk Index (CRI)

Hierbei sind PODI und CRI die reziproken Darstellungen von HI und MOE_T (Marquardt and Schäfer 2004, Feron et al. 1998, Cassee et al. 1998, Feron et al. 1995, Fay and Feron 1996, el-Masri et al. 1995, Choudhury et al. 2000, Sexton and Hattis 2007, Safe 1998, Wilkinson et al. 2000, Simmons and Gennings 1996, US-EPA 1986, BfR 2008, US-EPA 2006).

2.3 Licht

Licht unterliegt einem Welle-Teilchen-Dualismus, d.h. es wird beschrieben als

1. mit Korpuskeln vergleichbare Lichtquanten, auch Photonen genannt, die winzige Energiepakete darstellen

2. elektromagnetische Welle der Charakteristika $c = \nu * \lambda$ (mit: c = Phasengeschwindigkeit, im Vakuum $2,997 * 10^8 \text{ ms}^{-1}$, ν = Frequenz, λ = Wellenlänge)

Ein Zusammenhang beider Betrachtungsweisen ergibt sich über die Einführung der de-Broglie-Beziehung zu $E = m * c^2 = h * \nu$, wodurch sich auch die Energie eines Photons berechnen lässt (mit: E = Energie, h = Planck'sches Wirkungsquantum, $6,626 * 10^{-34} \text{ Js}$, ν = Frequenz). Um den Vergleich mit der Literatur zu erleichtern, sollen im Folgenden Unterscheidungen nur über die Wellenlänge λ gemacht werden, zumal bei größeren Wellenlängen die Welleneigenschaften dominanter werden (Wedler 1997).

Die wichtigste Lichtquelle ist die Sonne; diese emittiert als schwarzer Strahler mit einer Oberflächentemperatur von ca. 5500°C folgendes Spektrum elektromagnetischer (EM) Strahlung (Abb. 2.3a):

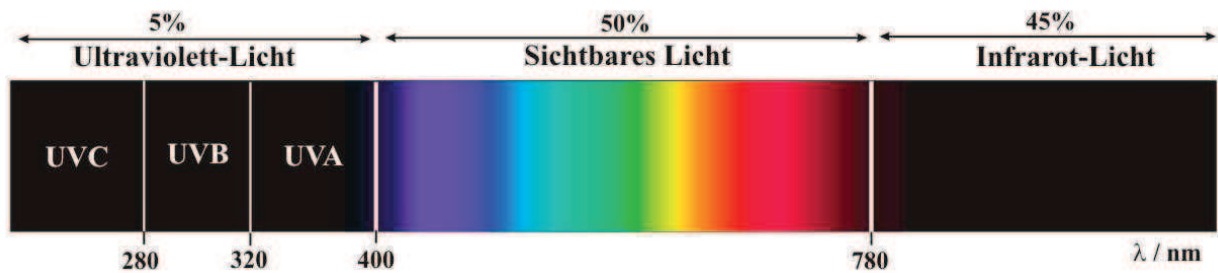


Abb. 2.3a: Elektromagnetisches Spektrum der Sonne, modifiziert nach (Svobodova, Walterova and Vostalova 2006)

Die von der Sonne emittierte EM-Strahlung setzt sich somit aus ca. 5% UV-Licht (200-400 nm), 50% sichtbarem Licht (400-780 nm) und 45% IR-Licht zusammen. Dabei absorbiert die Ozonschicht der Erde UVC-Licht bis ca. 290 nm völlig und UVB-Licht zu 70-90%, weshalb die die Erdoberfläche erreichende UV-Strahlung zu 95% aus UVA besteht. Mit zunehmender Zerstörung der Ozonschicht nimmt allerdings der Anteil der UVB- und sogar UVC-Strahlung auf der Erde zu.

Mit zunehmender Wellenlänge nimmt auch die Eindringtiefe der EM-Strahlung in die Haut zu: Wird UVC-Strahlung noch restlos von der Hornhautschicht absorbiert, erreicht UVB auch die tieferen Schichten der Epidermis (Oberhaut), UVA- und blaues Licht dringt bis in die Dermis (Lederhaut) ein und EM-Strahlung der Wellenlänge $\lambda > 490$ nm erreicht sogar die Subcutis (Unterhaut).

Im Bereich des sichtbaren Lichts erfolgt die Interaktion mit dem biologischen System hauptsächlich indirekt über exogene Chromophore, während UVA-Strahlung sowohl direkt als auch über Photosensitizer wie Furocumarine und Sauerstoff interagiert und UVB-Strahlung hauptsächlich direkt absorbiert wird. Die wichtigsten zellulären Chromophore sind dabei Nukleinsäuren wie DNA (vgl. 2.4) und RNA und aromatische Aminosäuren in Proteinen wie Keratin oder Kollagen. Durch Einwirkung von UVC-Strahlung können z.B. spezifische DNA-Schäden wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und (6-4)-Pyrimidin-Pyrimidon-Dimere (Abb. 2.3b) erfolgen, aber auch Einzelstrangbrüche, z.B. über ROS, werden induziert und oxidative DNA-Schäden (vgl. 2.5.5.2.4) wie 8-oxo-Guanosin werden gebildet. Weiterhin kann es zum Crosslinking verschiedener Zellkomponenten, wie z.B. des Fas-Rezeptor, oder generell zu Schäden in den Mitochondrien kommen.

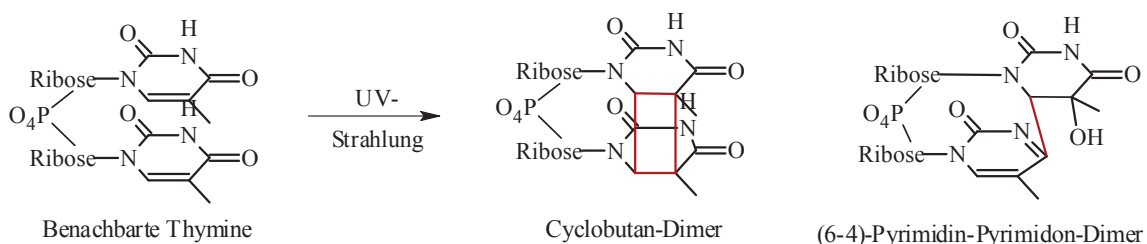


Abb. 2.3b: Durch UV-Strahlung induzierte Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und (6-4)-Pyrimidin-Pyrimidon-Dimere am Beispiel von Thymin, modifiziert nach (Batista et al. 2009)

Hierbei wird das Cyclobutan-Dimer häufiger gebildet und wird zudem langsamer durch die globale Genomreparatur (vgl. 2.4.2.2) repariert als das (6-4)-Dimer (Verhältnis ca. 3:1); die Reparatur über die transkriptionsgekoppelte Reparatur beider Dimere erfolgt etwa gleich schnell. Somit tragen vornehmlich Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere zur Mutagenität und Kanzerogenität von UV-Licht bei (Batista et al. 2009). Bei kürzeren UV-Wellenlängen (UVC und UVB) treten alle vier möglichen Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere etwa gleichverteilt auf, wobei Thymin-Cytosin- und Cytosin-Cytosin-Dimere besonders mutagen sind, da sie in C→T- und CC→TT-Transitionen resultieren. Dies führt zu einem typischen UV-Mutationsspektrum, wie es häufig z.B. im *p53*-Gen in UV-induzierten Krebszellen gefunden wird. Nach Einwirkung von UVA-Licht treten jedoch hauptsächlich (57%) Thymin-Thymin-Dimere auf (Rochette et al. 2003). Generell führt die Dimerbildung zu Störungen der DNA-Struktur, -Transkription und -Replikation, was in Zytotoxizität, Mutagenität und Induktion verschiedener, z.B. pro- und antiapoptotischer, Signalwege resultiert (Batista et al. 2009).

Hauptsächlich werden UV-induzierte DNA-Schäden durch UVC-Strahlung ausgelöst, da ihr Absorptionsmaximum in diesem Bereich liegt (DNA: 259 nm), UVB-Strahlung induziert diese Schädigungen 10^3 -fach weniger, UVA sogar 10^6 -fach. Dennoch verfügt UVA-Strahlung aufgrund ihrer höheren Eindringtiefe ebenso über z.B. ein kanzerogenes Potential. Zur Auslösung eines UVA-Erythems wird eine Schwellendosis von 20-30 J/cm² (hellhäutiger Hauttyp) bzw. 30-60 J/cm² (dunkelhäutig) benötigt. Zur Auslösung eines UVB-Erythems genügt bereits eine Dosis von 0,015-0,08 J/cm², was die erheblichen Unterschiede der Wellenlänge bezüglich der Induktion biologischer Effekte verdeutlicht.

Menschliche Exposition: Die tägliche maximal verfügbare UVA- / UVB-Dosis schwankt jahreszeitenabhängig erheblich von 127,8 / 6,2 J/cm² im Sommer über ca. 98,5 / 4,4 J/cm² im Frühjahr und Herbst bis zu 40,3 / 1,2 J/cm² im Winter ((Svobodova et al. 2006), Ort nicht näher genannt), in Schottland finden sich Werte von 4 J/cm² (Winter) bis zu 69 J/cm² (Sommer); an der französischen Riviera wurden im Sommer tägliche Gesamt-UV-Dosen über 150 J/cm² gemessen (Lelièvre et al. 2007). Ebenso tragen geographische Breite, Höhe über Meeresspiegel (Erhöhung der UV-Strahlung um 4% / 300 m), Bewölkung und Umgebung (80% Reflexion durch Schnee, 20% durch Sand und Asphalt) zu den Schwankungen bei. Die tatsächliche Exposition des Menschen liegt im einstelligen Prozentbereich der maximal verfügbaren Dosis und ist abhängig von den jeweiligen Lebensgewohnheiten wie Beruf, Kleidungsstil, Benutzung von Sonnencremes und Sonnenstudio, Freizeitgestaltung und Urlaub. So sind australische Büroarbeiter im Sommer etwa 4,2%, Farmarbeiter hingegen bis zu 14% der verfügbaren Dosis exponiert, US-amerikanische Jungen und Männer, die mehr Zeit im Freien verbringen, etwa 3,5%, Mädchen und Frauen etwa 2,8%. Im Durchschnitt sind in geschlossenen Räumen arbeitende Europäer 1-2 J/cm², US-Amerikaner 2-3 J/cm² und Australier 2-5 J/cm² UV-Licht pro Jahr exponiert, was sich durch Urlaub um 30% und Arbeiten im Freien um das 2,5-5-fache erhöhen kann (Svobodova et al. 2006, Thieden et al. 2005b, Thieden et al. 2005a). Andere Autoren schätzten, dass bis zu ein Drittel der maximal verfügbaren UV-Dosis den Menschen erreicht (Lelièvre et al. 2007). Generell erhalten z.B. britische Büroarbeiter 30% ihrer jährlichen UV-Dosis im Urlaub in der Sonne, 40% an sommerlichen Wochenenden, 20% durch beiläufige Exposition an Werktagen und nur 10% in der Zeit zwischen Oktober und März. Zusätzliche künstliche UV-Quellen wie Solarien

entsprechen in ihrer Leistung in etwa einem europäischen Sommermittag, was den UVB-Anteil betrifft, der UVA-Anteil liegt etwa um das 2-10-fache darüber.

Da die Relevanz dieser Zahlen für den Menschen nicht sofort ersichtlich ist, wurde zur alternativen Quantifizierung die „standard erythema dose“ (SED) vorgeschlagen. Dies entspricht der UV-Dosis, die ausreicht, bei den sensitivsten Menschen einer Gruppe sehr sonnenempfindlicher Menschen 24 h nach der Exposition ein wahrnehmbares Erythem auszulösen, und wurde auf 100 J/m² (10 mJ/cm²) UV-Licht der Wellenlänge 298 nm normiert. Die Schwellendosis zur Ausbildung eines Erythems liegt je nach Hauttyp zwischen 1,5-6 SED, an einem klaren europäischen Sommertag können etwa 30-40 SED erreicht werden. Thieden et al. (2005) beobachteten über ein personalisiertes UV-Dosimeter bei einer randomisierten Bevölkerungsgruppe von 1999 bis 2001 in Dänemark eine Exposition zwischen 0,1 und 23 SED/h (Duthie, Kimber and Norval 1999, Godar 2005, Boelsterli 2005, Diffey 1991, Diffey 2002a, Diffey 2002b, Moseley, Davison and MacKie 1983, Sheehan and Young 2002, Wedler 1997, Batista et al. 2009, Roza, van der Schans and Lohman 1985, Godar 1999, Young 2004, Schlatter 1988, Henriksen et al. 2004, Hönigsmann 2002, Marrot and Meunier 2008).

2.4 Desoxyribonukleinsäure (DNA)

2.4.1 Aufbau und Struktur der DNA

Die DNA (Desoxyribonukleinsäure) bzw. ein DNA-Molekül besteht aus zwei langen Polynukleotidketten (DNA-Strängen), die aus vier verschiedenen Nukleotiden zusammengesetzt sind. Diese bestehen entweder aus einer der beiden Purinbasen Adenin und Guanin oder den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin, die über eine glykosidische Bindung an 2-Desoxyribose, genauer 2-Desoxy-β-D-Ribose, gekoppelt sind. Diese sind wiederum über ihre 3'- und 5'-Hydroxygruppen mit meist einer Phosphatgruppe verestert, so aneinander gebunden und bilden damit das „Rückgrat“ der DNA (Abb. 2.4.1a):

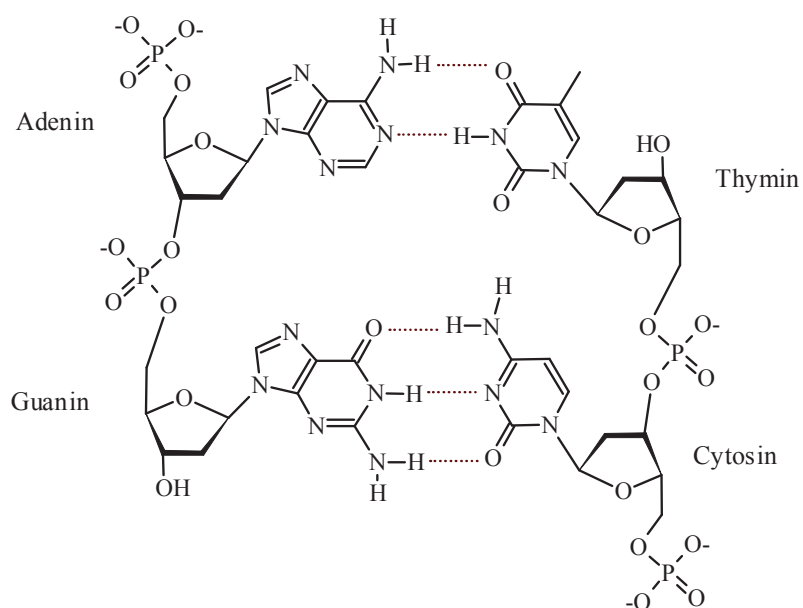


Abb. 2.4.1a: Ausschnitt eines komplementären DNA-Doppelstrangs, die Basen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin sind über zwei bzw. drei Wasserstoffbrücken koordiniert

Die beiden DNA-Einzelstränge lagern sich antiparallel zueinander an, immer spezifisch Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin gegenüber. Diese Anordnung wird über die Ausbildung zweier bzw. dreier Wasserstoffbrücken (vgl. Abb. 2.4.1.a) zwischen den beiden sog. Watson-Crick-Basenpaaren (BP) stabilisiert. Die Phosphat-Gruppen verleihen der DNA den Charakter eines Polyanions und bestimmen damit die Wanderungseigenschaften im elektrischen Feld. Im Fall freier Enden im Einzel- oder Doppelstrang, z.B. durch Reparaturprozesse (vgl. 2.4.2.2), entstehen in den meisten Reaktionen 5'-Phosphat und 3'-Hydroxy-Enden (Berg, Tymoczko and Stryer 2007, Neidle 2007).

Diese Polynukleotidketten formen eine dreidimensionale Doppelhelix, wovon drei verschiedene Strukturen existieren, A-DNA, B-DNA und Z-DNA, wobei die in der Zelle vorherrschende Form die B-DNA ist, die hier näher erläutert werden soll: Es handelt sich hierbei um eine positiv drehende Doppelhelix mit einem Durchmesser von 2 nm. Die gegenüberliegenden Basenpaare liegen jeweils auf einer Ebene, die senkrecht zur Achse der Helix stehen. Diese Ebenen sind 0,34 nm voneinander entfernt und die Watson-Crick-Paare jeweils um 36° zueinander versetzt. Somit hat eine volle Helixwindung eine Länge von 34 nm und beinhaltet 10,4 – 10,6 Basenpaare (Abb. 2.4.1b):

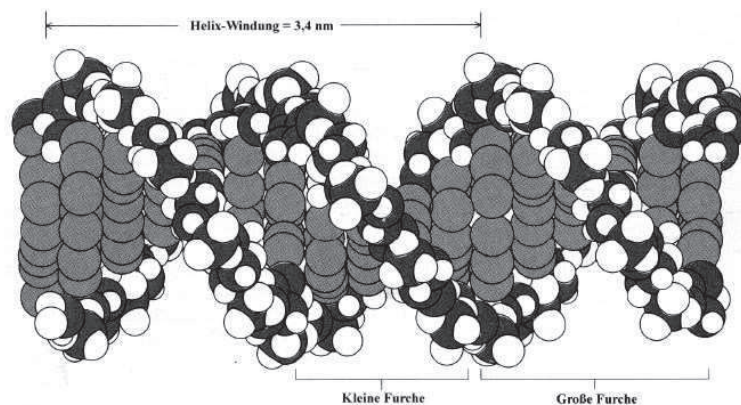


Abb. 2.4.1b: Helikale Struktur der DNA mit kleiner und großer Furche

In Abb. 2.4.1b sind entlang der Spiralwindung der Helix eine große (0,85 nm tief, 1,2 nm breit, „major groove“) und eine kleine (0,75 nm tief, 0,6 nm breit, „minor groove“) Furche zu erkennen, in die sich sowohl Moleküle wie Interkalatoren oder Liganden der kleinen Furche, aber auch Proteine anlagern und / oder binden können. Sie entstehen, weil die glykosidischen Bindungen eines Basenpaares nicht exakt diametral gegenüberstehen.

Eine zusätzliche Stabilisierung der Konformation wird durch hydrophobe Bindungen („stacking forces“) erreicht, die aus den Wechselwirkungen der π -Elektronen der horizontal gestapelt liegenden Basenpaare („base stacking“) resultieren (Berg et al. 2007, Neidle 2007, Alberts et al. 2003).

Eukaryontische DNA befindet sich, im Gegensatz zu prokaryontischer DNA, in einem Zellkern und ist in unterschiedliche Chromosomen aufgeteilt. Die humane DNA besteht aus etwa $3,2 \cdot 10^9$ Basenpaaren, was einem DNA-Strang von ca. 2 m entspricht. Da der Zellkern nur einen Durchmesser von ca. 6 μm hat, muss die DNA geordnet aufgefaltet und stufenweise in eine höhere Organisation gebracht werden, um nicht unauflösbar verknäult zu werden (Abb. 2.4.1c):

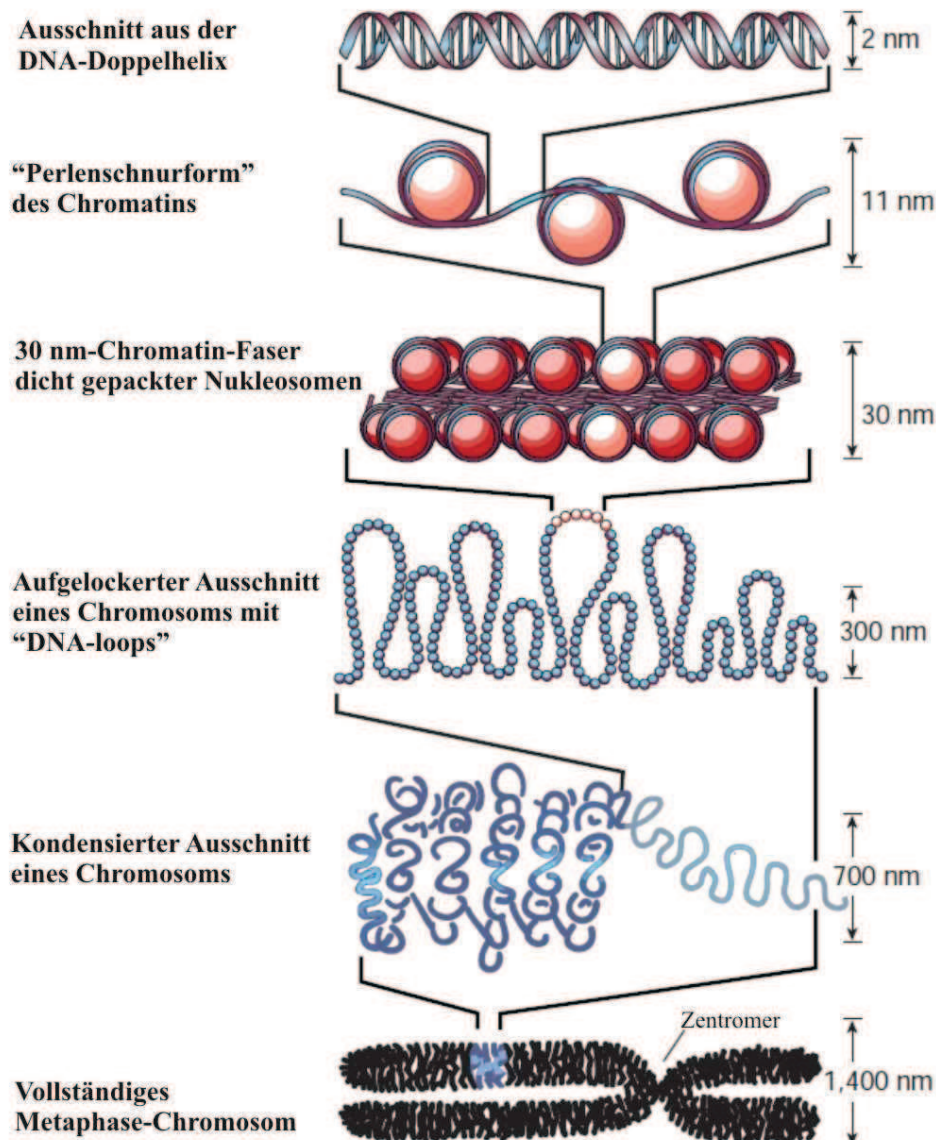


Abb. 2.4.1c: Aufbau der DNA von der Doppelhelix zum Chromosom, modifiziert nach (Felsenfeld and Groudine 2003)

Zunächst entsteht über die Ausbildung der Nukleosomen ein Chromatinfaden, wodurch eine Verkürzung der DNA-Helix auf ein Fünftel bis Zehntel ihrer ursprünglichen Länge erreicht wird. Diese bestehen aus einem Proteinkern, d.h. einem Histon-Oktamer aus je zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4, um das ein DNA-Stück von ca. 165 BP zweimal gewickelt wird, und die über ein Stück „Linker-DNA“ von bis 10-80 BP verbunden sind. Die nächste Verdichtung auf etwa ein Fünfzigstel wird durch die Einführung des Histons H1 erreicht, das den Polynukleosomen-Strang über eine Bindung zwischen einem Nukleosom und gegenüberliegende Linker-DNA verbindet. Dies resultiert in einer 30 nm-Faser oder -Fibrille aus etwa sechs schraubenförmig angeordneten Nukleosomen, die mit einer Gesamtlänge von 1 mm immer noch über 100-mal größer als der Zellkern ist. Die nächste Möglichkeit der Verdichtung der entstandenen Fibrillen ist das Ausbilden von Schleifen („DNA-loops“), die wiederum in einem letzten Schritt über Anker-Chromatinsequenzen („scaffold/matrix-attachment regions“, S/MARs) mit einem Proteingerüst gekoppelt sind, wobei dessen Struktur noch nicht geklärt ist. Bei vollständiger Packung resultiert daraus das Metaphase-Chromosom.

Man bezeichnet die 30 nm-Fibrille und DNA-Schleifen als Euchromatin, jede weitere Verdichtung als Heterochromatin. In einer typischen Säugerzelle liegt etwa 10% des Genoms als Heterochromatin vor, welches transkriptionsinaktiv ist. Aber auch im Interphasechromatin oder in Kernen ruhender Zellen, in denen die meisten Vorgänge des DNA-Metabolismus ablaufen, bleibt die kompakte Struktur der DNA weitgehend erhalten, wobei Faltung und Entfaltung kein statischer, sondern ein dynamischer Prozess sind. Dennoch kann die Transkription nicht auf einmal stattfinden, da der Platz im Zellkern begrenzt ist, weshalb die vollständige, zur Transkription benötigte Entfaltung (Entschlingen der Schleifen, Dekondensation der 30 nm-Fibrillen, Auflösen oder Beiseiteschieben der Nukleosomen, Entspiralisierung durch Topoisomerasen) sogar während der DNA-Replikation nur Domäne für Domäne stattfindet (Alberts et al. 2003, Berg et al. 2007, Felsenfeld and Groudine 2003, van Driel, Fransz and Verschure 2003, Hardy et al. 2004, Heng et al. 2004).

2.4.2 Schäden an der DNA und mögliche Folgen

Die Stabilität und Integrität der DNA kann durch zahlreiche schädigende Agenzien endogenen und exogenen Ursprungs beeinflusst werden. Zu ersteren zählen z.B. während des Stoffwechsels generierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) oder fehlerhafte Replikation, zu letzteren z.B. Mutagene, Alkylantien, ROS oder Röntgenstrahlung. Die Zahl der Schädigungsereignisse in einer menschlichen Zelle wird pro Tag auf etwa 10^4 - 10^6 geschätzt, womit bei einem erwachsenen Menschen (10^{12} Zellen) 10^{16} - 10^{18} Reparaturereignisse stattfinden müssen, um sowohl die einzelne Zelle als auch den Gesamtorganismus vor Gefahren zu schützen. Einen Überblick möglicher Folgen von DNA-Schäden gibt Abb. 2.4.2 (Schärer 2003):

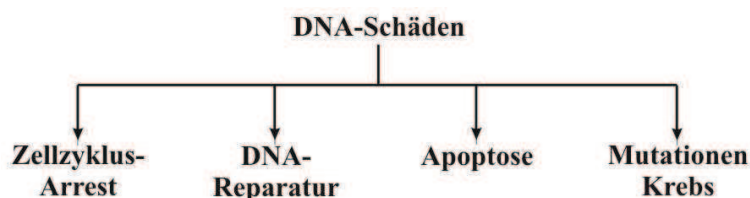
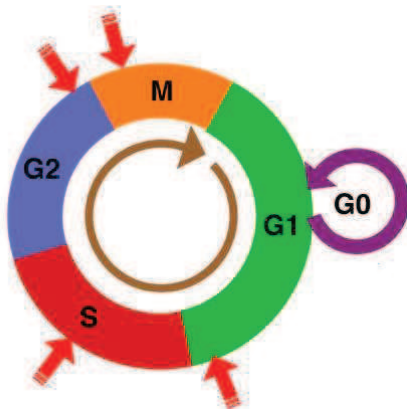


Abb. 2.4.2.: Mögliche Konsequenzen aus DNA-Schäden, nach (Schärer 2003)

Auf diese Konsequenzen wird im Folgenden mit speziellem Augenmerk auf Furocumarin-induzierte Schäden eingegangen.

2.4.2.1 Zellzyklusarrest & Apoptose



Der Zellzyklus lässt sich in vier Hauptphasen einteilen: Die S-Phase (Synthese-Phase), in der die DNA dupliziert wird, die M-Phase (Mitose-Phase), bei der alle Zellkomponenten inklusive DNA auf zwei Tochterzellen aufgeteilt wird, und die dazwischen liegenden G₁- und G₂-Phasen (Gap bzw. Lücke). In der G₁-Phase wird durch Synthese aller benötigten Proteine die DNA-Replikation für einen erneuten Zellzyklus vorbereitet; alternativ kann die Zelle in eine Wachstums- und Differenzierungsphase (G₀-Phase) eintreten. In der G₂-Phase bereitet sich die

Zelle auf ihre Teilung vor. Um den fehlerfreien Ablauf des Zellzyklus zu gewährleisten, sind vier Kontrollpunkte zwischengeschaltet: der Restriktionspunkt am Ende der G₁-Phase, der Intra-S-Phase-Checkpoint, der G₂/M-Checkpoint am Ende der G₂-Phase und der Spindel-Kontrollpunkt am Metaphase/Anaphase-Übergang innerhalb der Mitose. Beim Feststellen eines Fehlers wird hier bis zu dessen Reparatur der Übergang in die nächste Phase verzögert; ist er irreparabel, kommt es zur Apoptose (programmierter Zelltod).

Reguliert wird der Zellzyklus über die (De-)Phosphorylierung seiner Kontrollproteine, den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs, cyclin-dependent kinases), von denen nur CDK1-4, 6 & 7 am Zellzyklus beteiligt sind und die erst als Komplex mit bestimmten Cyclinen regulatorisch wirksam sind. Die aktiven CDK/Cyclin-Komplexe sind dabei Zellzyklus-Phasen-spezifisch und leiten so über ihren Auf- und Abbau die nächste Phase ein.

Findet nun eine DNA-Schädigung statt, kommt es hauptsächlich über eine Serin-/Threoninkinase, die ATM (ataxia telangiectasia mutated), zu einer posttranskriptionalen Hochregulierung des Tumorsuppressorproteins p53, wobei der genau Mechanismus der Aktivierung durch DNA-Schäden noch nicht bekannt ist. p53 wiederum aktiviert p21, einen CDK/Cyclin-Inhibitor, der einen G₁-Arrest auslöst. Weiterhin induziert ATM über noch nicht aufgeklärte Mechanismen eine Verlangsamung der S-Phase und einen G₂-Arrest (vgl. Abb. 2.4.2.1.b)(Elledge 1996). Varga et al. (1982) fanden in murinen Melanomzellen sowohl bei niedrigen Konzentrationen des Furocumarins 4'-Hydroxymethyltrioxsalen (HMT) in Kombination mit UVA-Strahlung einen G₂-Arrest als auch bei höheren eine Blockierung der S- und G₁-Phase. Viola et al. (2004) konnten in HL-60 Leukämie-Zellen am Beispiel von 5-MOP und 8-MOP einen Arrest in der G₂/M-Phase zeigen, wohingegen Angelicin und TMP Apoptosen ohne Zellzyklusarrest auslösten.

Ben-Hur und Elkind (1973) konnten an V79-Zellen einen klaren Zusammenhang zwischen der Furocumarin-DNA-Crosslink-Ausbildung unter UVA-Licht und den beobachteten zytotoxischen Effekten zeigen; subletale Schäden wurden angehäuft und während der Zytostase prozessiert. Die DNA-Adduktbildung von FCs in Kombination mit UVA-Strahlung ist *in vitro* die Hauptursache zytotoxischer Effekte, andere Ursachen wie z.B.

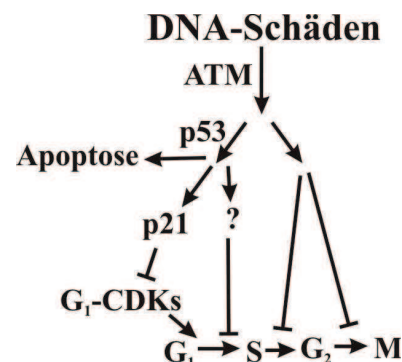


Abb.2.4.2.1b: DNA-Schäden und Konsequenzen, nach (Elledge 1996)

Membranschädigungen durch ROS können zumindest für 5-MOP vorerst vernachlässigt werden (Ben-Hur and Elkind 1973, Bethea et al. 1999, Musajo and Rodighiero 1972). Sollten die DNA-Schäden irreparabel sein, ist p53 weiterhin in der Lage, eine Signalkaskade auszulösen, die zur Apoptose führt. Im Falle von DNA-Schäden, wie sie durch Furocumarine in Kombination mit UVA-Licht induziert werden, wird eine verzögerte Apoptose eingeleitet, da hier die für den Signalweg erforderlichen Proteine erst nach der Schädigung synthetisiert werden müssen. Am Ende der Signalkaskade stehen die Effektor-Caspasen 3 und 7, die die proteolytische Spaltung von Zellsubstraten katalysieren und somit für die morphologischen Veränderungen der Zelle bei der Apoptose verantwortlich sind (Elledge 1996, Gervais, Seth and Zhang 1998, Godar 1999, Lowndes and Murguia 2000, Sheehan and Young 2002, Viola et al. 2004).

2.4.2.2 Reparatur

Bei den durch Furocumarine in Kombination mit UVA-Licht induzierten Schädigungen der DNA handelt es sich im Wesentlichen um FC-DNA-Monoaddukte, daraus entstehende Crosslinks mit dem komplementären DNA-Strang (vgl. 2.5.5.2), aber auch oxidative Basenmodifikationen (Madle, Beek and Nowak 1993, Obe, Johannes and Schulte-Frohlinde 1992, Schumacher 2005, Youssefi, Arutyunyan and Emerit 1994, Khanna and Jackson 2001).

Reparatur von Furocumarin-DNA-Monoaddukten, „bulky adducts“:

FC-DNA-Addukte gehören wie UVC-induzierte Pyrimidin-Dimere, Benzo[a]pyren- oder Mitomycin C-Addukte zu den sog. „bulky adducts“. Diese sterisch anspruchsvollen Addukte führen zu einer zusätzlichen Deformation des DNA-Rückgrats, welche aber bei FCs geringer ausgeprägt ist. Die FC-DNA-Addukte werden durch die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER, nucleotide excision repair), an der etwa 30 Proteine beteiligt sind, repariert. Die NER teilt sich auf in die globale Genomreparatur (GGR), bei der die nicht-transkribierte DNA repariert wird, und die schnellere, transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR, transcription-coupled repair). Während bei der GGR die modifizierte(n) Base(n) durch den XPC-hHR23B-Komplex über die DNA-Deformation erkannt wird/werden, wird die TCR vermutlich über die blockierte RNA-Polymerase intiiert; ansonsten verlaufen die weiteren Schritte analog. Es werden Helicasen rekrutiert, die die DNA-Helix zu einer Blase von ca. 25 Basenpaaren um den NER-Komplex öffnet, der nach der Schadensüberprüfung die richtige Positionierung der Endonucleasen XPG und ERCC1/XPF gewährleistet. Diese schneiden der Nähe des DNA-Schadens in 3'- bzw. 5'-Position ein Oligonucleotid von etwa 27-29 Nucleotiden heraus. Durch eine Reparatursynthese wird die entstandene Lücke mit dem komplementären Strang als Vorlage aufgefüllt und über die DNA-Ligase I verschlossen (Braithwaite, Wu and Wang 1999, Dronkert and Kanaar 2001, Kuraoka et al. 2000, Schäfer 2003, Svoboda et al. 1993, Lowndes and Murguia 2000, Zhou and Elledge 2000, Kaina 1993, Obe et al. 1992).

Reparatur von Furocumarin-DNA-Crosslinks:

Ein zusätzliches Problem bei Furocumarin-DNA-Addukten ist die Fähigkeit von FCs, Interstrand-Crosslinks (ICL) auszubilden; etwa 40% der Monoaddukte können in Crosslinks umgewandelt werden. Diese sind besonders toxisch, da sie die DNA-

Transkription und -Replikation verhindern, da die komplementären Stränge nicht voneinander getrennt werden können. Die Prozessierung von ICLs in Säugerzellen ist noch nicht geklärt. Vermutet wird, dass die Reparatur über die Bildung von Doppelstrangbrüchen (DSB) verläuft, wie sie auch nach Einwirkung von ionisierender Strahlung oder Sauerstoffradikalen beobachtet wird. Dabei werden DSB durch homologe Rekombination (HR) oder nicht-homologes Endjoining (NHEJ) behoben. Hinweise über die Reparatur von FC-DNA-ICLs können von Hefen erhalten werden, wobei diese in Säugerzellen wesentlich komplizierter zu verlaufen scheint. Zudem ist kein einzelner Signalweg für die Reparatur verantwortlich, sondern mehrere, abhängig von der Position und Art des ICL, dem Zellzyklus oder der Chromatinstruktur.

Induziert werden können die Strangbrüche vor dem ICL durch die NER. Ohne homologe DNA kann der Strangbruch durch NHEJ repariert werden. Entweder können die Enden direkt wieder durch den DNA-Ligase-Komplex ligiert oder müssen erst zu ligierbaren 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden prozessiert werden, was zum Verlust kurzer Nucleotid-Sequenzen und somit Fehlern führen kann.

Ist homologe DNA als Vorlage in Form eines Schwesterchromatids verfügbar, kann der DSB durch homologe Rekombination (HR) repariert werden, wie in Abb. 2.4.2.2 exemplarisch dargestellt (schwarz: beschädigter Doppelstrang, weiß: homologe DNA, türkis: neu synthetisierter Strang). Die Enden des Doppelstrangs werden nucleolytisch prozessiert, um dann entlang des homologen DNA-Strangs, der als Matrize dient, wieder vollständig synthetisiert zu werden. Dabei kommt es zur Ausbildung sog. Holliday-Junctions, d.h. Verbindungen zwischen den homologen DNA-Strängen, die im letzten Reparaturschritt mit Austausch einer kurzen DNA-Sequenz wieder getrennt werden. Alternativ kann es hier zum Austausch des ganzen Chromatids kommen (Schwester-Chromatid-Austausch, SCE), die durch monofunktionale

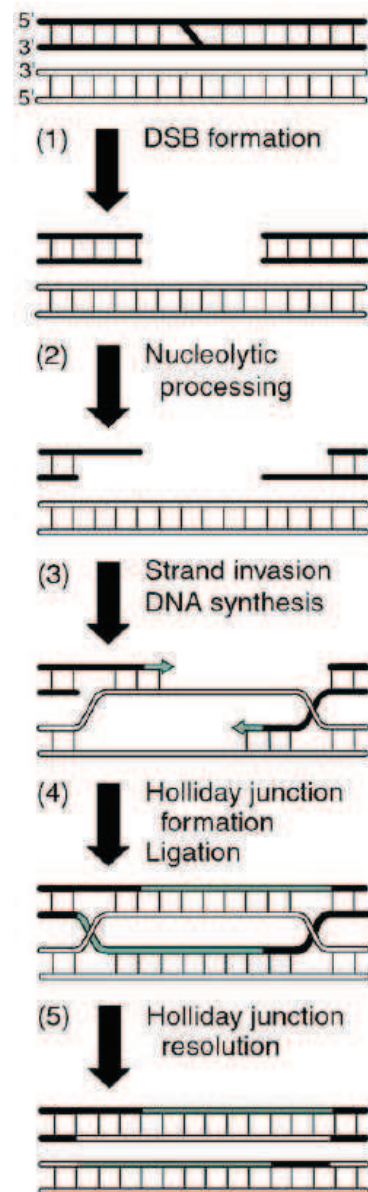


Abb. 2.4.2.2: Homologe Rekombination, nach (Dronkert and Kanaar 2001)

Reparatur von oxidativen Basenmodifikationen:

Die Reparatur fast aller oxidativen Schäden erfolgt durch die Basen-Exzisions-Reparatur (BER, base excision repair) und ist von den o.g. Schädigungen am leichtesten durchzuführen. Die geschädigte Base, wie z.B. 8-Hydroxy-Deoxyguanosin (8-OH-dG) und Formamidopyrimidin (FaPy), wird spezifisch von einer DNA-Glykosylase erkannt und an der N-glykosidischen Bindung abgespalten. Die entstehende abasische Stelle (AP-Stelle) wird nun von DNA-AP-Endonuclease oder -Lyase am 5'- oder 3'-Ende des Zuckers

geschnitten und ein neues, komplementäres Nucleotid über die eine DNA-Polymerase eingefügt. Entweder wird der überschüssige Zucker-Phosphat-Rest direkt über die Polymerase entfernt (short-patch pathway) oder ein kurzes Stück DNA (2-7 Nucleotide) am neuen Nucleotid synthetisiert und dann erst die überschüssigen Nucleotide entfernt (long-patch pathway), bevor die Schnittstellen wieder über die DNA-Ligase zusammengefügt werden (Braithwaite et al. 1999, Robertson et al. 2009, Schärer 2003).

2.4.2.3 Mutationen

Mutationen sind vererbare Modifikationen der DNA. Sie entstehen in der Regel, wenn gentoxische Agenzien (z.B. endo- und exogene reaktive Chemikalien, ionisierende und UV-Strahlung) auf die DNA einwirken (Aktivierung), die daraus resultierenden Schäden nicht ausreichend von den zelleigenen Kontrollen (Zellzyklus-Kontrollpunkte, DNA-Reparaturmechanismen oder Apoptose) erkannt und so während der DNA-Replikation fixiert werden. Dies resultiert schließlich während der Zellteilung einer überlebensfähigen Zelle in einem Mutanten-Klon (vgl. Abb.: 2.4.2.3).

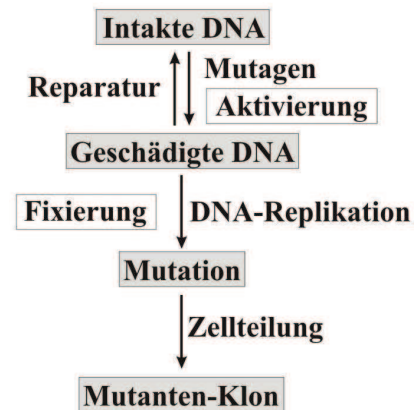


Abb. 2.4.2.3: Mutagenese

Mögliche Schädigungen sind dabei Schäden an den DNA-Basen (z.B. Alkyladdukte, Oxidationen, Dimere), Schäden am DNA-Rückgrat (z.B. Strangbrüche), Crosslinks (z.B. Interstrand-CLs, Protein-Addukte) oder aberrante *nonduplex*-DNA-Formen (z.B. DNA-Blasen, Holliday-Strukturen).

Generell lassen sich Mutationen in drei verschiedene Typen unterscheiden:

1. Genmutationen: Veränderung der Basensequenz der DNA, die auf ein einzelnes Gen beschränkt und nicht lichtmikroskopisch erkennbar sind; hier ist zu unterscheiden zwischen:
 - Basenpaarsubstitutionen (Austausche einzelner Basen) mit der Unterscheidung
 - Transition (Purin- gegen Purin- bzw. Pyrimidin- gegen Pyrimidin-Base)
 - Transversion (Pyrimidin- gegen Purin-Base und umgekehrt)
 - Frameshift- bzw. Rasterschub-Mutationen mit der Unterscheidung
 - Insertion (Addition) eines oder mehrerer Basenpaare
 - Deletion (Verlust) eines oder mehrerer Basenpaare
2. Chromosomenmutationen: Lichtmikroskopisch sichtbare Veränderung der Chromosomenstruktur, auch Aberrationen genannt, die durch Clastogene verursacht werden; die wichtigsten Typen vererbbarer Aberrationen sind:
 - Deletionen (Verlust kleinerer Stücke)
 - Duplikationen (Verdopplung eines Abschnittes)
 - Inversionen (umgedrehte Abschnitte)
 - Translokationen (Verschiebung eines Stücks innerhalb eines Chromosomensatzes)
 - Ringchromosomen
3. Genommutationen: Veränderung der Chromosomenzahl mit der Unterscheidung
 - Aneuploidie: Verlust eines oder mehrerer ganzer Chromosomen
 - Polyploidie: Addition von Chromosomen, z.B. durch Fehler bei der Meiose (Aigner 2006, Würgler 1993, Eckardt-Schupp and Ahne 1993, Kaina 1993, Efferth 2006, Marquardt and Schäfer 2004).

Im Allgemeinen umfasst die Gentoxizitäts-Basisprüfung *in vitro* einen Bakterien-Rückmutationstest (Ames-Test) als erstes Screening und sollte weiterhin die Endpunkte Genmutationen, Chromosomenaberrationen und Aneuploidien abdecken, was durch die in dieser Arbeit verwendeten HPRT- und Mikrokern-Assays gewährleistet wird. Es besteht zudem eine gute mathematische Korrelation zwischen Mutagenität und Kanzerogenität *in vivo* (ECHA 2008, Reichl and Schwenk 2004, Frötschl 2007).

2.4.2.4 Kanzerogenese

Die Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle unterliegt einem Mehrstufenprozess, der nach Armitage und Doll in Tumor-Initiation, -Promotion und -Progression unterteilt werden kann (Abb. 2.4.2.4). Neuere Modelle, wie das Zwei-Stufen-Modell der klonalen Expansion nach Moolgavkar et al., schließen auch eventuell auftretende intermediäre Zellpopulationen und unterschiedliche Wachstumsraten der Populationen mit ein, auf die aber hier nicht näher eingegangen werden soll. Krebs entsteht meist nach der Einwirkung verschiedener endogener (z.B. genetische Prädisposition) und exogener (versch. Chemikalien, ionisierende Strahlung, Viren) Risikofaktoren, die hauptsächlich in den Phasen der Initiation und Promotion wirken; etwa 80-90% der Krebserkrankungen im Menschen werden durch exogene Faktoren verursacht (DiGiovanni 1992, Kaina and Hengstler 2004, Marquardt and Schäfer 2004):

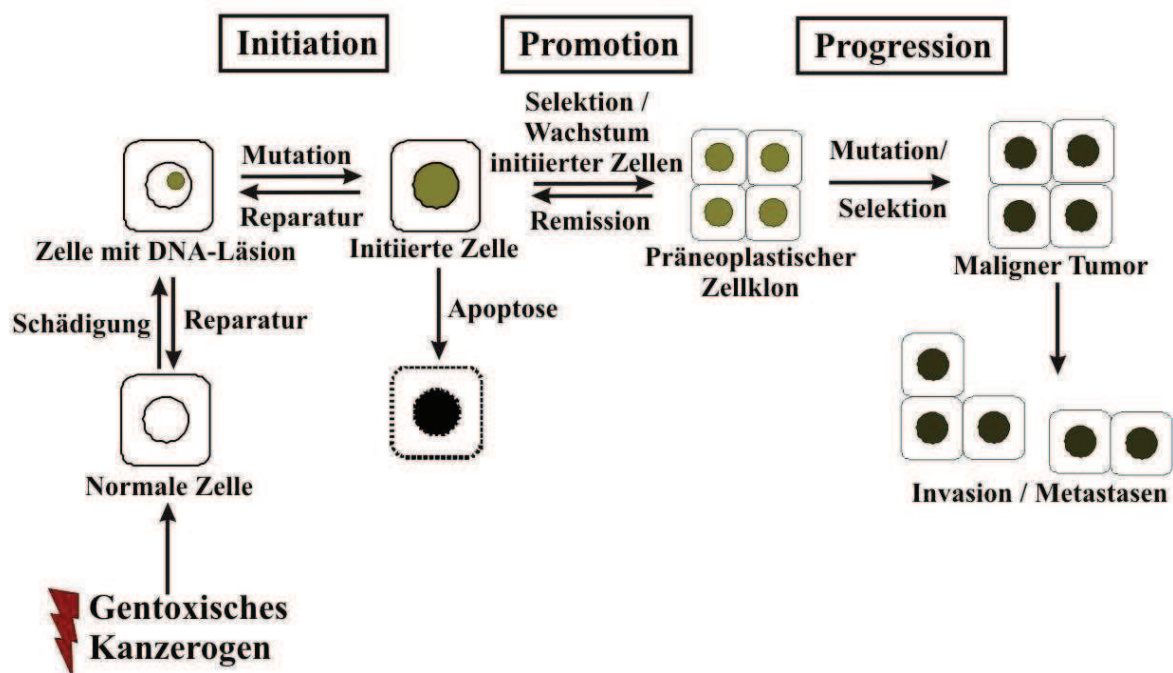


Abb. 2.4.2.4: Mehrstufenmodell der Kanzerogenese, nach (DiGiovanni 1992, Kaina and Hengstler 2004, Marquardt and Schäfer 2004)

Wirkt ein gentoxisches Agens auf eine Zelle, kann dies zunächst in einer DNA-Läsion resultieren, aus der in seltenen Fällen bei mangelhafter Reparatur eine Mutation entstehen kann (vgl. 2.4.2.3). Dieser irreversible, aber seltene Schritt wird als Initiation bezeichnet, der nur einzelne, verstreut im Gewebe liegende proliferationsfähige Zellen betrifft. Diese

Zelle erhält nun gegenüber nicht initiierten Zellen einen Wachstumsvorteil, wenn z.B. Protoonkogene aktiviert oder Tumorsuppressorgene inaktiviert werden, der aber ohne anschließende Promotion nur geringe phänotypische Auswirkungen hat; die Zelle selbst ist meist dedifferenziert und unterscheidet sich morphologisch und biochemisch vom umliegenden Gewebe. Die Initiation erfolgt rasch („Puls-Kanzerogenese“) innerhalb weniger Stunden oder Tagen, wobei eine einmalige Exposition oft genügt, kann aber auch insbesondere in höherem Lebensalter spontan erfolgen. Für eine Tumorentstehung ist die Initiation alleine allerdings nicht ausreichend.

Der zweite operative Schritt ist die Promotion, also die selektive, klonale Expansion der initiierten Zelle. Sie erfolgt im Gegensatz zur Initiation oft organspezifisch über einen längeren Zeitraum, sie ist reversibel und unterhalb einer Schwellendosis des Promotors nicht wirksam. Die Promotion ist oft mit Enzyminduktion und Wachstum, aber auch mit Schädigung des umgebenden Gewebes assoziiert und führt zur Vergrößerung der präneoplastischen Zellpopulation und Bildung gutartiger Tumoren.

Die Progression ist der finale Schritt der mehrstufigen Kanzerogenese, bei der die durch Initiation und Promotion entstandenen Präneoplasien und gutartigen Tumoren in maligne Geschwülste umgewandelt werden, und die aus zahlreichen Schritten genotypischer und phänotypischer Veränderungen besteht. Genotypisch charakteristisch für die Tumorzellen ist die genetische Instabilität, die vor allem auf dem Verlust oder der Beschädigung von an der DNA-Reparatur beteiligten Genen beruht. Diese Instabilität muss nicht einheitlich sein, sondern es können innerhalb des Tumors auch Subklone entstehen. Phänotypisch charakteristisch ist ihr uneingeschränktes Vermehrungspotential durch Resistenz gegenüber Apoptose und Aufrechterhaltung ihrer Telomerstabilität, autonome Produktion von Wachstumssignalen und Insensitivität gegenüber anti-Wachstumsfaktoren.

Schließlich zeichnen sich maligne Tumoren durch ihre Fähigkeit aus, in umliegendes Gewebe eindringen und metastasieren zu können.

Generell können Kanzerogene unterschieden werden in Initiatoren, d.h. direkt genotoxische Verbindungen, Promotoren, die i. A. die Wachstumskontrolle beeinflussen, wie z. B. TCDD oder mechanische Reizung, oder Solitärkanzerogene wie Nitrosamine, Aflatoxine oder Röntgenstrahlung (Aigner 2006, DiGiovanni 1992, Hanahan and Weinberg 2000, Kaina and Hengstler 2004, Marquardt and Schäfer 2004, Pathak 1990).

2.5 Furocumarine

Furocumarine (FC) oder Psoralene sind sekundäre Pflanzenmetaboliten, die u.a. von Doldenblütlern (*Umbelliferae*) oder Rautengewächsen (*Rutaceae*) als Phytoalexine in Stresssituationen wie Schädlingsbefall gebildet werden. Somit kommen sie auch in pflanzlichen Lebensmitteln wie Sellerie oder Grapefruit vor. Ihr Grundgerüst besteht aus einem Cumarin mit ankondensiertem Furanring; abhängig von der Position des Furanrings unterscheidet man zwischen linearen (Psoralene) oder angularen (Angelicine oder Isopsoralene) Furocumarinen. Es existieren aus historischen Gründen drei verschiedene Nomenklatorsysteme, im Folgenden soll die gebräuchlichste biomedizinische Furocumarin-Nomenklatur verwendet werden (Baumann, Dick and Zimmerli 1988, Bode 2004, Guth 2006, IARC 1986, Isaacs, Wiesehahn and Hallick 1984, Ivie 1978, Musajo and Rodighiero 1972, Ramaswamy 1975, Schlatter 1988, Scott, Pathak and Mohn 1976, Wagstaff 1991).

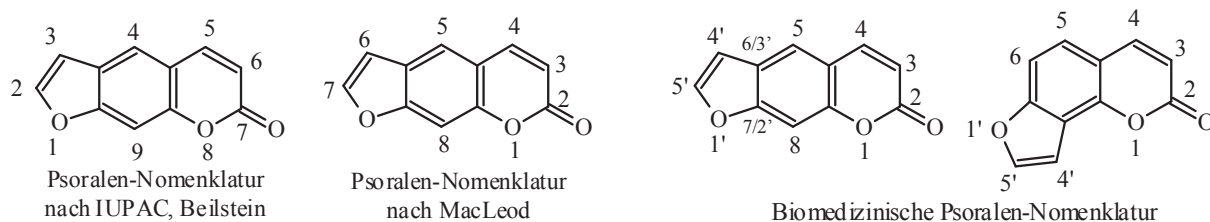


Abb. 2.5a: Nomenklatorsysteme der Furocumarine

Durch Addition verschiedener Substituenten resultiert aus diesen Grundgerüsten eine hohe Anzahl verschiedener Substanzen. Über 90 natürlich vorkommende Derivate sind bisher isoliert, die durch eine Vielzahl synthetisch hergestellter Derivate ergänzt werden. Im Folgenden aufgeführt ist eine Auswahl natürlich vorkommender Furocumarine, die auch in dieser Arbeit näher untersucht werden.

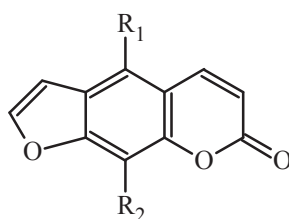
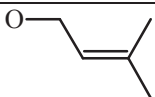
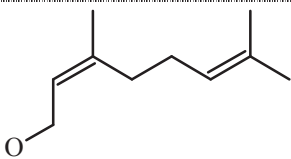
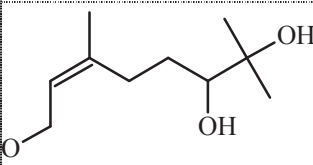
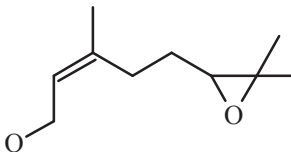


Abb. 2.5.1a Psoralen-Typ

Tab. 2.5.1a: Untersuchte Furocumarine vom Psoralen-Typ

Psoralen-Typ	R ₁	R ₂	Molmasse [g/mol]
Psoralen	H	H	186,17
5-Methoxypsoralen (5-MOP)	OCH ₃	H	216,19
8-Methoxypsoralen (8-MOP)	H	OCH ₃	216,19
Isopimpinellin	OCH ₃	OCH ₃	246,22
Bergaptol	OH	H	202,16
Xanthotoxol	H	OH	202,16
Oxypeucedanin		H	286,28
Oxypeucedaninhydrat		H	304,30
Byakangelicin	OCH ₃		334,32
Heraclenin	H		286,28
Imperatorin	H		270,28
Isoimperatorin		H	270,28

Psoralen-Typ	R ₁	R ₂	Molmasse [g/mol]
Phellopterin	OCH ₃		300,31
Bergamottin		H	338,40
6',7'-Dihydroxybergamottin (DHB)		H	372,41
Epoxybergamottin		H	354,40

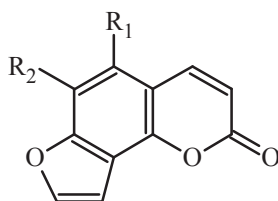


Abb. 2.5.1b Angelicin-Typ

Tab. 2.5.1b: Untersuchte Furocoumarine vom Angelicin-Typ

Angelicin-Typ	R ₁	R ₂	Molmasse [g/mol]
Angelicin	H	H	186,17
Isobergapten	OCH ₃	H	216,19
Sphondin	H	OCH ₃	216,19
Pimpinellin	OCH ₃	OCH ₃	246,22

Abhängig von den Substituenten variiert auch die Ausprägung ihrer Eigenschaften, wie Komplexbildung mit der DNA und photoinduzierter Bindung an die DNA, Photo-Toxizität, -Mutagenität und -Kancerogenität, Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder die Modulation des Fremdstoffmetabolismus. Auf diese Eigenschaften soll in den folgenden Abschnitten näher eingegangen werden. Zusätzlich werden in dieser Arbeit auch die Eigenschaften der strukturähnlichen Verbindungen Limettin und Khellin untersucht, die photodynamisch aktiv sind (Ashwood-Smith, Poulton and Liu 1983, Morliere et al. 1988, Guo et al. 2000, Guo and Yamazoe 2004, Lohr, Raquet and Schrenk 2010, Loveday 1996, Musajo and Rodighiero 1972, Scott et al. 1976, Song et al. 1975):

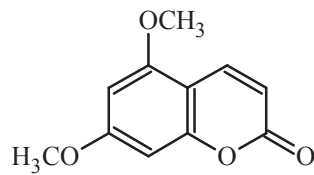


Abb. 2.5.1b: Limettin

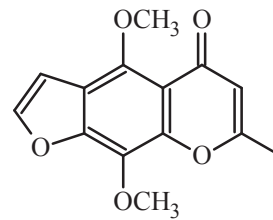


Abb. 2.5.1c: Khellin

2.5.1 Vorkommen

Furocumarine kommen hauptsächlich in folgenden Pflanzenfamilien vor:

- Doldenblütler bzw. Doldengewächse (*Apiaceae* oder *Umbelliferae*), zu denen Karotten (*Daucus carota*), Pastinaken (*Pastinaca sativa*) oder Sellerie (*Apium graveolens*) gehören, die als Gemüse verwendet werden, Gewürze wie Petersilie (*Petroselinum crispum*) oder Anis (*Pimpinella anisum*), oder auch der Riesen-Bärenklau (*Heracleum mantegazzium*), Auslöser der sog. „Wiesen-Dermatitis“ und Angelika (*Angelica archangelica*), die in pflanzlichen Medikamenten Verwendung findet.
- Rautengewächse (*Rutaceae*), zu denen auch Zitrusfrüchte gehören, z.B. Limette (*Citrus aurantiifolia*), Grapefruit (*Citrus paradisi*), Zitrone (*Citrus limon*) oder Orange (*Citrus sinensis*), deren Saft und Öle auch für Getränke Verwendung finden.
- Hülsenfrüchtler bzw. Leguminosen (*Fabaceae*) wie Erbsen (*Pisum sativum*) und Linsen (*Lens culinaris*) oder Zierpflanzen, wie z.B. Wicke (*Vicia villosa*)

Ferner, wenn auch in geringerem Maße, kommen sie in den Familien der *Moraceae*, *Mediaceae*, *Rosaceae*, *Asteraceae*, *Elagnaceae*, *Zygophyllaceae*, *Lamiaceae*, *Rhamnaceae*, *Sterculiaceae*, und *Rubiaceae* vor.



Abb. 2.5.1: Furocumarinhaltige Pflanzen, v.l.n.r.: Grapefruit (*Citrus paradisi*), Sellerie (*Apium graveolens*), Angelika (*Angelica archangelica*)

Einige relevante Beispiele an Furocumarin-Zusammensetzungen und -Gehalten in Obst, Gemüse, sonstigen Pflanzen und pflanzlichen Zubereitungen gibt Tab. 2.5.1. Da Furocumarine allerdings als Phytoalexine infolge von Stresssituationen wie mikrobieller Infektion, Schädlingsbefall oder ungünstigen Lagerbedingungen gebildet werden, können die hier aufgeführten Werte auch drastisch ansteigen. So zeigten Chaudhary et al. (1985) einen Anstieg auf das Fünf- bzw. 25-fache bei gelagertem (4°C) bzw. pilzinfiziertem und

gelagertem Staudensellerie, Ostertag et al. (2002) zeigten sogar einen Anstieg des FC-Gehalts in gelagerten und mikrobiell infizierten Pastinaken von 2,5 mg/kg auf 566 mg/kg.

Tab. 2.5.1: Furocumarinergehalte ausgewählter Pflanzen und -Zubereitungen

Pflanze / pflanzliche Zubereitung	Furocumarin-Gesamtgehalt [mg/kg]	Analysierte Furocumarine	Literaturquelle
Knollensellerie	<46,7	5-MOP, 8-MOP, IP, P	(Baumann et al. 1988)
Staudensellerie	1,8	P, 5-MOP, 8-MOP	(Chaudhary et al. 1985)
Staudensellerie, gelagert und mikrobiell infiziert	<43,8	P, 5-MOP, 8-MOP	(Chaudhary et al. 1985)
Pastinaken	1-4	5-MOP, 8-MOP, A, IP, P	(Ostertag et al. 2002)
Pastinaken, gelagert u. mikrobiell infiziert	566		
Petersilie	11,4-121,5	5-MOP, 8-MOP, P, I, IsI, IP, Oxp, OxH	(Baumann et al. 1988, Chaudhary et al. 1986)
Limettenschale	<1434,9 (674,3)	5-MOP, 8-MOP, P, IP, L, Bgm	(Nigg et al. 1993, Lohr 2008)
Limettenöl	<46700	Bgm, I, IsI, IP, PH, Oxp, CAS 69239-53-8, CAS 71612-25-4, 5-MOP	(Stanley and Vannier 1967, Cieri 1969)
Caipirinha	10,5 (5,3)	L, IP, 5-MOP, Bgm	(Gorgus et al. 2010)
Grapefruitsaft	<81,6	Bgm, DHB, BO, EpB, PA, PB, PC	(Fukuda et al. 2000, Guo et al. 2000, Raquet 2007, Uesawa and Mohri 2006)
Bergamottöl	<3900	5-MOP	(Cieri 1969, Opdyke 1973)
<i>Angelica archangelica</i> , Wurzel	7318	A, AR, 5-MOP, I, IsI, Oxp, OxH, 8-MOP, X, P, PH, BY, EpB, H	(HMPC 2007, SteigerwaldArzneimittel werke 2007)
<i>Angelica archangelica</i> , alk. Wurzel auszug	767	5-MOP, Bgm, I, IP, OxH, 8-MOP, PH, BY	(SteigerwaldArzneimittel werke 2007)

5-MOP=5-Methoxypsoralen, 8-MOP=8-Methoxypsoralen, A=Angelicin, AR=Archangelicin
 Bgm=Bergamottin, BO=Bergaptol, BY=Byakangelicin, DHB=6',7'-Dihydroxybergamottin
 EpB=Epoxybergamottin, H=Heraclenin, I=Imperatorin, IsI=Isoimperatorin IP=Isopimpinellin, L=Limettin,
 Oxp=Oxypeucedanin, OxH=Oxypeucedaninhydrat, P=Psoralen, PA=Paradisins A, PB=Paradisins B,
 PC=Paradisins C, PH=Phellopterin, X=Xanthotoxol

Deutlich zu sehen an den ausgewählten Beispielen ist, dass nur die wenigsten Pflanzen ein einziges Furocumarin vorrangig produzieren; vielmehr sind mitunter komplexe FC-Gemische die Regel (Ostertag et al. 2002, Ramaswamy 1975, Steinhoff 2007, Baumann et al. 1988, Chaudhary et al. 1985, Ashwood-Smith, Ceska and Chaudhary 1985, Ceska et al. 1986, Hiller and Melzig 2006).

2.5.2 Biosynthese

Bei den meisten Furocumarin-bildenden Pflanzen ist die Biosynthese durch biotische oder abiotische Stressfaktoren höchst induzierbar mit Ausnahme der Weinraute (*Ruta graveolens*). Der Syntheseweg verläuft bei den FC-bildenden Pflanzen recht einheitlich und ist in Abb. 2.5.2 dargestellt:

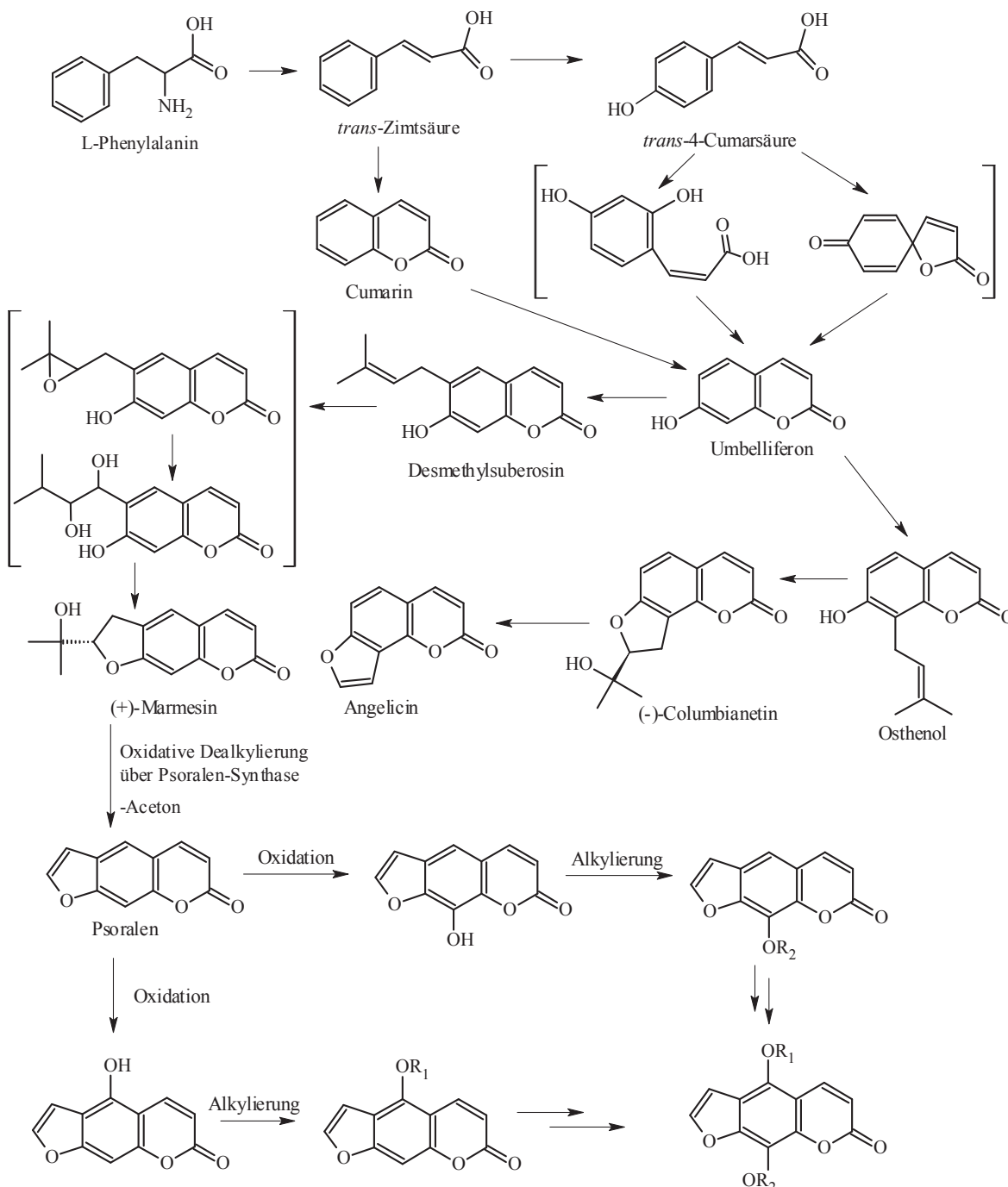


Abb. 2.5.2: Furocumarin-Biosynthese nach (Caporale et al. 1981, Ishikawa et al. 2009, Stanjek, Miksch and Boland 1997, Stanjek, Piel and Boland 1999b, Wink 1999); $R_1, R_2 = \text{z.B. } \text{CH}_3$

Ausgehend von L-Phenylalanin wird über *trans*-Zimtsäure Umbelliferon synthetisiert. Allerdings ist nicht eindeutig, über welchen Weg. Nur wenige Pflanzen sind in der Lage, Cumarin zu hydroxylieren, und es konnte auch noch nicht geklärt werden, wie die

Cyclisierung der *trans*-Cumarsäure vonstatten geht. Umbelliferon kann nun an C⁶ oder C⁸ prenyliert werden. Die Prenylierung an C⁶ resultiert in Desmethybsuberosin, welches dann in Gegenwart von NADPH und O₂ über die „Marmesin-Synthase“ (später als CYP-Monooxygenase identifiziert) zu (+)-Marmesin cyclisiert wird. Die Darstellung von (-)-Columbianetin erfolgt vermutlich analog an C⁸. Psoralen wird nun über eine oxidative Desalkylierung durch die Psoralen-Synthase dargestellt. Auch wenn in der Biosynthese eine Abspaltung von Aceton eher ungewöhnlich ist, konnten bisher keine Intermediate gefunden werden. Über eine Sequenz von Oxidationen und Alkylierungen werden nun z.B. die methoxylierten FC-Derivate gebildet (Caporale et al. 1981, Wink 1999, Floss and Mothes 1966, Ishikawa et al. 2009, Stanjek et al. 1997, Stanjek et al. 1999a, Stanjek et al. 1999b).

2.5.3 Toxikokinetik / Toxikodynamik

2.5.3.1 Exposition

Neben der gezielten oralen, dermalen, intravenösen oder rektalen Aufnahme von Furocumarinen im Zusammenhang mit der PUVA-Therapie (Psoralen + UVA-Bestrahlung, vgl. 2.5.6) kann es auch zur unbeabsichtigten Aufnahme kommen. Die Hauptexpositionsquelle ist der Verzehr FC-haltiger Nahrung wie Grapefruitsaft, Sellerie, Petersilie, pastinakenhaltige Babybreie oder andere Zubereitungen, aber auch mit Zitrusölen aromatisierte Getränke, sollten diese nicht destillativ gewonnen worden sein, oder pflanzliche Medikamente, die z.B. Angelika-Auszüge enthalten.

Eine weitere Expositionsmöglichkeit ist der dermale Kontakt mit FC-haltigen Pflanzen, beispielsweise bei der Sellerieernte, der Kontakt mit dem weißlichen Saft des auch in Mitteleuropa heimischen Wiesenbärenklau (*Heracleum sphondylium*) oder der Herkulesstaude (*Heracleum mantegazzeanum*) oder auch bei der Herstellung selbstgemachter Limonade mit Limetten.

Mitte der 1990er Jahre wurden auch FC-haltige Bräunungscremes auf den Markt gebracht, wobei mittlerweile der FC-Gehalt laut Kosmetik-Verordnung (2007) auf weniger als 1 mg/kg zu beschränken ist. Außerdem können auch Parfüms Limetten- oder Bergamottöl enthalten (Gorgus et al. 2010, Schlatter et al. 1991, SKLM 2006, SKLM 2010, Wagstaff 1991, Berkley et al. 1986, Ivie, Holt and Ivey 1981, Guth 2006, Autier et al. 1997, Kosmetik-Verordnung 2007, Baumann et al. 1988, HMPC 2007, Weber, Davis and Greeson 1999).

2.5.3.2 Resorption / Kinetik

Oral:

Die Bioverfügbarkeit oral aufgenommener Furocumarine variiert sehr stark von Individuum zu Individuum. Sie ist zusätzlich abhängig von der galenischen Formulierung (gelöst / kristallin), wie FCs in der PUVA-Therapie (vgl. 2.5.6) eingesetzt werden, ob sie in Kombination mit Nahrung verabreicht werden oder von der Nahrungsmittelmatrix selbst, sollte es sich dabei um FC-haltige Pflanzen handeln. Über die Toxikokinetik der

meisten Furocumarine ist wenig bekannt, die meisten Daten wurden aufgrund ihres Einsatzes in der PUVA-Therapie von 5-MOP und 8-MOP erhoben. Allgemein gilt jedoch, dass Furocumarine im Gastrointestinaltrakt beinahe restlos resorbiert werden. Sie gelangen so über die Pfortader in die Leber, wo sie zunächst einem sättigungsfähigen hepatischen First-Pass-Effekt unterliegen und erreichen dann den Blutkreislauf. Voraussetzung dafür ist, dass die „Breakthrough-Dose“, d.h. die Dosis, bei der der Metabolismus der Leber ausgelastet ist, überschritten ist. Schmid et al. (1980b) schätzten, dass so 60-80% gelöst verabreichten 8-MOPs (40 mg) systemisch verfügbar sind. Der Maximalwert der FC-Plasma-Konzentration wird formulierungs- und substanzabhängig im Menschen 1-4 h nach oraler Verabreichung gefunden mit einer Halbwertszeit von 0,5-2 h. Die Verteilung unterliegt einer nicht-linearen Kinetik, die am ehesten als Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden kann. Kornhauser et al. (1982) konnten an Meerschweinchen einen linearen Zusammenhang zwischen dem 8-MOP-Serum-Level und der 8-MOP-Konzentration in der Epidermis, dem eigentlichen Target für phototoxische Ereignisse, zeigen; das Verhältnis $8\text{-MOP}_{\text{Plasma}}:8\text{-MOP}_{\text{Epidermis}}$ betrug etwa 3:2. Typische Plasma-Level in der PUVA-Therapie sind ca. 200 ng/ml nach 2 h.

Generell sind aufgrund der schlechten Löslichkeit der Furocumarine gelöst verabreichte Formulierungen besser resorbierbar als kristalline. Weiterhin wird die Aufnahme über die Gabe der Reinsubstanz zusammen mit Nahrung beeinflusst. Bech-Thomsen et al. (1992) zeigten eine Abnahme der FC-Konzentration im Plasma und eine zeitlich verzögerte Aufnahme bei einer kombinierten Gabe von Furocumarinen mit Nahrung, wohingegen Ehrsson et al. (1994) einen Anstieg im FC-Serum-Level in Kombination mit Nahrung fanden.

Auch ist die Resorption von Furocumarinen aus der Nahrungsmittelmatrix schlechter als die der Reinsubstanz. Schlatter et al. (1991) konnten zeigen, dass FC-Gehalte im Plasma nach der Aufnahme von 10 mg FC-Dosisäquivalenten über Sellerie unterhalb der Nachweisgrenze lagen, wohingegen die Aufnahme der gleichen FC-Menge in Lösung zu messbaren Gehalten im Plasma führte. Dies führten sie auf die längere Resorptionsdauer zurück, weswegen die „Breakthrough-Dose“ des First-Pass-Effekts nicht erreicht wurde, oder generell auf die geringe Bioverfügbarkeit in Sellerie.

Furocumarine werden im Menschen metabolisiert (2.5.3.3) zu ca. 90% über den Urin und 10% über Faeces nach 12 h ausgeschieden (Lowe et al. 1987, Brickl, Schmid and Koss 1984, Schlatter et al. 1991, Bech-Thomsen, Angelo and Knudsen 1992, de Wolff and Thomas 1986, Schmid et al. 1980a, Stolk and Siddiqui 1988, Stolk et al. 1985, Ehrsson et al. 1994, John et al. 1992, Shephard, Langguth and Panizzon 2001, Schmid et al. 1980b, Kornhauser, Wamer and Giles 1982, Roelandts et al. 1983).

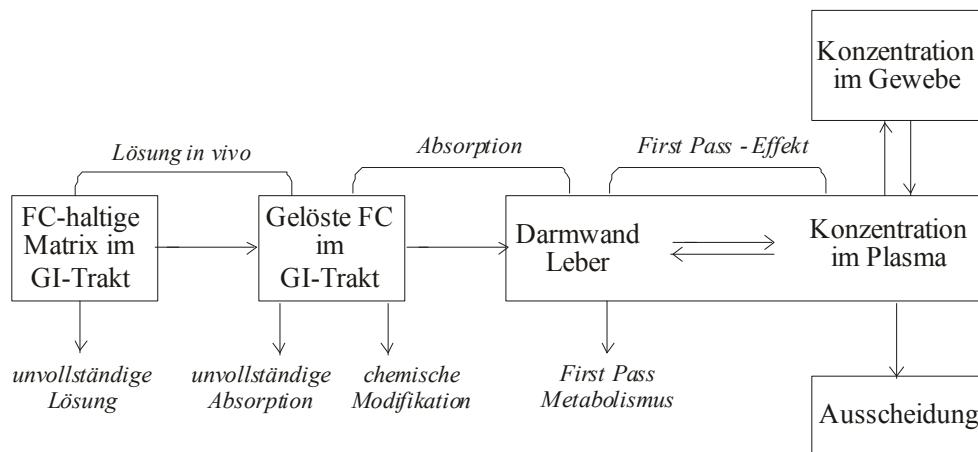


Abb. 2.5.3.2: Einflüsse auf die Furocumarinverteilung *in vivo* nach oraler Aufnahme nach (Brickl et al. 1984)

Topische Anwendung:

Kammerau et al. (1976) konnten zeigen, dass Furocumarine (8-MOP, in wasserhaltiger Wollwachsalkoholsalbe) innerhalb von 10 min in die Epidermis und Dermis eindringen und die Konzentration von 40-60 μM bzw. 10 μM über einen Zeitraum von 16 h konstant bleibt. 4-40 h nach Applikation konnte 8-MOP auch im Urin nachgewiesen werden.

Die Plasma-Werte topisch applizierter Furocumarine liegen in der gleichen Größenordnung wie die der oral aufgenommenen; weiterhin ist die Diffusion und Akkumulation in der Haut reziprok abhängig von ihrer Lipophilie (Kammerau et al. 1976, Said et al. 1997, de Wolff and Thomas 1986).

I.v.-Gabe:

Intravenös verabreichte FC-Lösungen werden sowohl in Menschen als auch Hunden sehr schnell nach Beenden der Infusion in einem nicht-linearen Verlauf ausgeschieden (Monbaliu, Belpaire and Bogaert 1988a, Monbaliu et al. 1988b, Billard et al. 1995).

2.5.3.3 Metabolismus / Interaktion mit Enzymsystemen

Metabolismus der Furocumarine:

Furocumarine werden in Säugern zum Großteil in der Leber über CYP-abhängige Monooxygenasen metabolisiert. Im Gegensatz zum Cumarin erfolgt die Metabolisierung in der Leber nicht an der 3,4-Doppelbindung des Lactonrings, sondern hauptsächlich an der 4',5'-Doppelbindung des Furanrings. Weiterhin ist die Methoxygruppe am Beispiel des 8-MOP am C⁸ im Menschen im Gegensatz zur Ratte relativ stabil. Hauptwege der Biotransformation sind Epoxidierung, Hydroxylierung, Glucuronidierung und Hydrolyse. Einen Überblick am Beispiel von 8-Methoxypsoralen gibt Abb. 2.5.3.3 nach John et al. (1992), Mays et al. (1989) und Schmid et al. (1980a). Die Metaboliten von Mensch und Hund werden im Urin hauptsächlich als Glucuronsäure-Konjugate ausgeschieden, während sie in der Ratte meist unkonjugiert auftreten. Im späteren Verlauf der Exkretion treten auch an der 3,4-Doppelbindung metabolisierte FCs auf, die vermutlich nicht in der Leber, sondern in der gastrointestinalen Mikroflora gebildet werden (Boelsterli 2005, Guth 2006, John et al. 1992, Kent et al. 2006, Koenigs and Trager 1998a, Koenigs and Trager 1998b, Mays et al. 1989, Schmid et al. 1980a, Ehrsson et al. 1994).

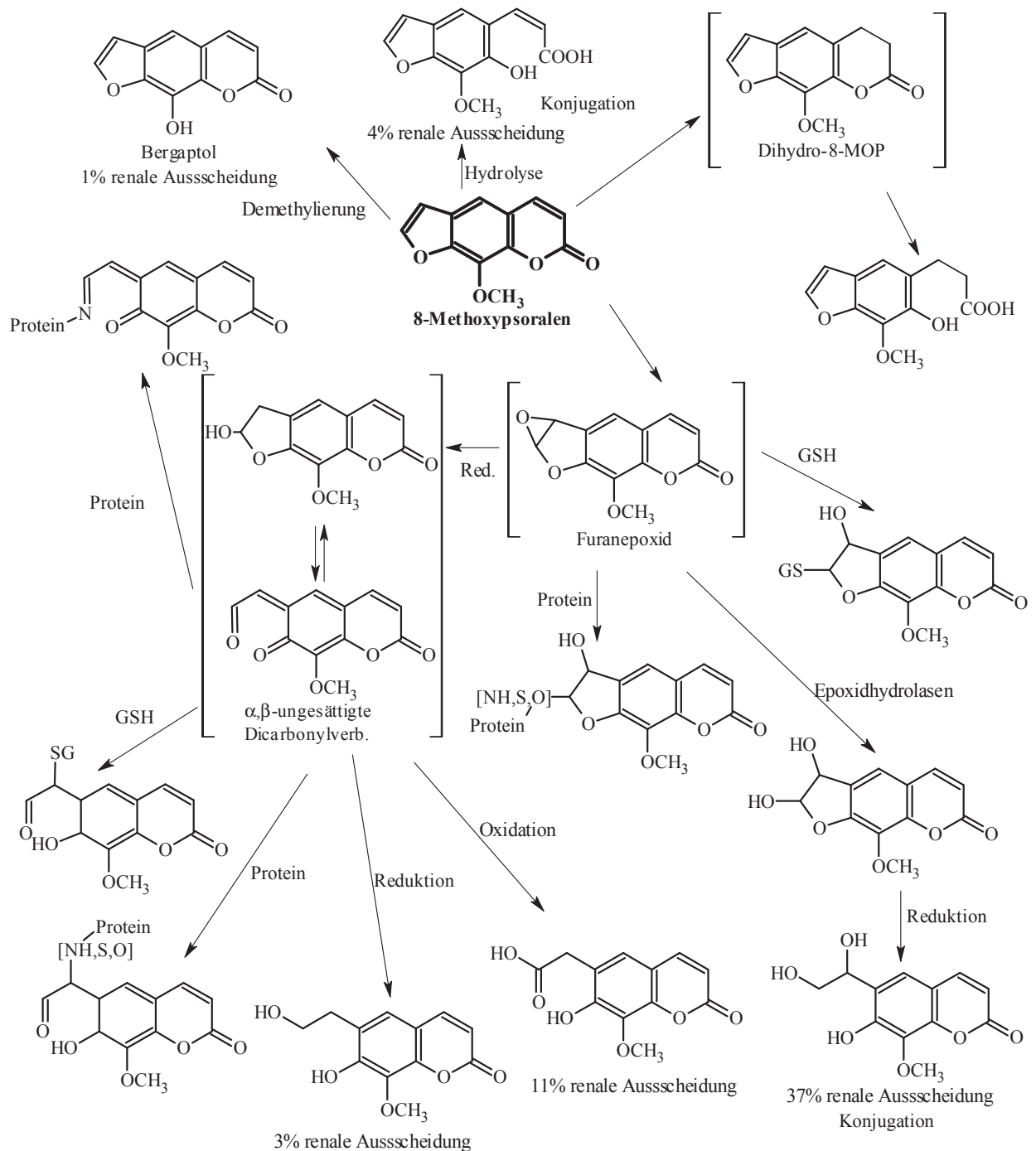


Abb. 2.5.3.3: Postulierter Weg der Metabolisierung von 8-MOP nach (John et al. 1992, Mays et al. 1989, Schmid et al. 1980a)

Weitere Angriffspunkte für die Metabolisierung stellt bei einigen Furocumarinen die Seitenkette dar: Kent et al. (2006) fanden durch Metabolisierung von Bergamottin neben dem schon beschriebenen Bergaptol, verschiedenen Furanepoxiden und deren Glutathion-Konjugaten auch Metaboliten mit hydroxylierter Geranyl-Seitenkette. Dabei entstanden durch Metabolisierung über CYP3A5 6',7'-Dihydroxybergamottin (DHB) und 2'- und 5'-OH-Bergamottin, über CYP2B6 5'-, 6'- und 7'-OH-Bergamottin.

Einfluss von Furocumarinen auf Enzymsysteme:

Furocumarine sind selektive Inhibitoren verschiedener Cytochrom-P450-Isoenzyme wie CYP3A4, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6 CYP2C9, CYP2A6 oder CYP2D19. Zu den potentesten Inhibitoren gehören die im Grapefruitsaft vorkommenden Furocumarine Bergamottin, 6',7'-Dihydroxybergamottin, Epoxybergamottin und die Furocumarin-Dimere Paradisin A, B und C. Essentiell für die Inhibierung scheint das Furocumarin-Gerüst zu sein, da analoge Cumarine (z.B. Geranoylcumarin) ineffektiv sind. Die Inhibierung kann hier konzentrations- und zeitabhängig sowohl kompetitiv als auch mechanismusbasiert („Suicide Inactivation“) erfolgen: FCs zeigen auch induktive Effekte, wodurch sie ihren eigenen Metabolismus induzieren. Die daraus resultierenden Metaboliten (vgl. Abb. 2.5.3.3) können nun über drei verschiedene Mechanismen das zuvor induzierte Enzym inaktivieren: 1. Alkylierung der prosthetischen Hämgruppe des CYP, 2. Kovalente Bindung an das Apoprotein oder 3. Fragmentierung der prosthetischen Hämgruppe des CYP, wobei die daraus resultierenden Produkte ebenfalls wieder an das Apoprotein binden können. So inhibiert z.B. 8-MOP CYP2A6 über das 8-MOP-Epoxid über die kovalente Modifizierung eines Aminosäurerests des CYP-Apoproteins. Bergamottin und DHB sind in der Lage, CYP3A4 sowohl reversibel als auch irreversibel zu hemmen.

Als Folgen für den Menschen sind hier Furocumarin-Arzneimittel-Interaktionen zu nennen, wie sie z.B. beim Verzehr von Grapefruitsaft auftreten können, da die Pharmakokinetik und -dynamik zahlreicher Medikamente wie Nifedipin, Verapamil oder Felodipin von CYP-Isoenzymen abhängig sind. So können FCs deren Bioverfügbarkeit, Plasmaspiegel und Eliminationszeiten verändern, was wiederum zu unerwünschten Nebenwirkungen und Über- oder Unterdosierungen führt (Baumgart et al. 2005, Boelsterli 2005, Guth 2006, Cai et al. 1996, Guo et al. 2000, Koenigs and Trager 1998a, Koenigs and Trager 1998b, Ehrsson, Eksborg and Wallin 1978, John et al. 1992, Schmid et al. 1980a, Kent et al. 2006, Girennavar, Jayaprakasha and Patil 2007, Lin, Kent and Hollenberg 2005, Paine, Criss and Watkins 2005, Wangenstein et al. 2003, Guo and Yamazoe 2004, Tassaneeyakul et al. 2000, Mays et al. 1989, Fukuda et al. 2000, Bickers and Pathak 1984, Fuhr 1998).

2.5.4 Wirkungen von Furocumarinen ohne Lichteinfluss

Neben den unter 2.5.3.3 beschriebenen Interaktionen mit dem Fremdstoffmetabolismus, der reversiblen Bindung an Serumproteine und Epidermis (2.5.5.2.2) und der Komplexbildung mit den Basen der DNA (2.5.5.2.1) sind u.a. folgende Wirkungen im Tierversuch unter Lichtausschluss beschrieben:

Akute Toxizität: Die akute Toxizität von Furocumarinen ist stark spezies- und formulierungsabhängig. So konnten für Nager LD₅₀-Werte von 200-4000 mg/kg KG 8-MOP und für Meerschweinchen nach oraler Aufnahme 505 mg/kg KG ermittelt werden, wohingegen für 5-MOP orale LD₅₀-Werte von 8100 mg/kg KG für Mäuse, >30000 mg/kg KG für Ratten und 9000 mg/kg KG für Meerschweinchen gefunden wurden. In Hunden führten Dosen von 100 und 400 mg/kg KG 5-MOP über acht Tage zu Verhaltensstörungen, blasiger Dermatitis, bilateraler Hornhautentzündung und verminderten Appetit. Angelicin zeigte in Ratten, Mäusen und Kaninchen sedative, antikonvulsive und muskelrelaxierende Effekte mit einem LD₅₀-Wert von 321 mg/kg KG (oral) bzw. 165 mg/kg KG (i.p.) für

Ratten (Apostolou, Williams and Comerkeski 1979, Chandhoke and Ghatak 1975, Herold et al. 1981).

Subchronische Toxizität: In weiblichen Fischer 344-Ratten konnte ab 200 mg/kg KG 8-MOP (oral, 5 d / Woche, 90 Tage) u.a. eine erhöhte Sterblichkeit, Verminderung des Körpergewichts und Atrophie in den Tubuli, Prostata und Samenbläschen beobachtet werden. 5-MOP (48 bzw. 60 mg/kg KG verabreicht über vier bzw. 13 und 26 Wochen) verursachte in Hunden in zwei Studien Anorexie und Verminderung des KG bzw. Störungen in der Gallenfunktion, erhöhtes Lebergewicht sowie Nekrosen und Entzündungen in der Leber (Dunnick et al. 1984, Herold et al. 1981).

Reproduktions- / Entwicklungs-Toxizität: Die Studien von Diawara et al. an Wistar-Ratten mit oralen Gaben von 5-MOP und 8-MOP zeigten eine dosisabhängige Verminderung der Geburtenzahl und Gewichtszunahme. Bei den männlichen Tieren konnte eine Verminderung des Hypophysengewichts, der Spermienzahl und der Anzahl erfolgreicher Begattungen sowie eine Erhöhung des relativen Hodengewichts und Testosteronspiegels festgestellt werden. Weibliche Ratten zeigten eine Erniedrigung des Östrogenspiegels mit Reduktion der ovariellen Follikelfunktion und der Ovulation (Diawara et al. 1997, Diawara and Kulkosky 2003, Diawara et al. 2001).

Gentoxizität / Mutagenität: Ohne Lichteinfluss sind Furocumarine nur schwach mutagen, mit UVA-Licht sind sie hingegen in verschiedensten Testsystemen gentoxisch (vgl. 2.5.5.3).

Psoralen, 8-MOP und Angelicin induzierten Frameshift-Mutationen in *E. coli lac⁻*, 8-MOP weiterhin in *Salmonella typhimurium*, wohingegen 5-MOP nur in *E. coli* WP2 *try⁻* Frameshift-Mutationen induzierte, nicht aber in *S. typhimurium*.

Oxypeucedanin und Heraclenin, zwei Furocumarin-Epoxide, waren in einigen *S. typhimurium*-Stämmen unter Lichtausschluss mutagen, zeigten aber an *Clamydomonas reinhardtii* keinerlei Effekte.

In Säugerzellen induzierte 8-MOP Mutationen, Schwester-Chromatid-Austausche (SCE) und Chromosomenaberrationen, Heraclenin zeigte chromosomenschädigende Effekte und Imperatorin und Heraclenin sind unter Lichtausschluss potentiell clastogen (Quinto et al. 1984, Ivie, Macgregor and Hammock 1980, Schimmer and Abel 1986, Ashwood-Smith et al. 1980, Ashwood-Smith 1978).

Kanzerogenität: Ohne Lichteinfluss sind nur wenige kanzerogene Effekte dokumentiert. 8-MOP bewirkte bei oraler Gabe (37,5 u. 75 mg/kg KG, 5 d / Woche, 103 Wochen) an männlichen F334/N-Ratten eine dosisabhängige Erhöhung der Inzidenzen für tubuläre Zellhyperplasie, Adenome und Adenokarzinome der Niere und Karzinome der Zymbaldrüse (Dunnick 1989).

Sonstige Effekte: Unter Zellkulturbedingungen konnten für 8-MOP folgende, wenn auch transiente, Effekte festgestellt werden: Verminderte Erkennung kultivierter T-Lymphozyten durch ihre monoklonalen Marker, Verdopplung der Mitosenzahl PHA-stimulierter Lymphozyten und einen 20-fachen Anstieg der Genexpression für den EGF-Rezeptor transformierter humaner Keratinozyten (Zarebska 1994). Heraclenin und Imperatorin inhibieren konzentrationsabhängig die rezeptorvermittelte Proliferation primärer humaner T-Zellen, weiterhin inhibiert Imperatorin die Transkription von *Interleukin-2* (Marquez et al. 2004).

2.5.5 Wirkungen von Furocumarinen in Kombination von UVA-Licht

Furocumarine sind in der Lage, nach Absorption eines Photons geeigneter Wellenlänge (Grotthuss-Draper-Gesetz), verschiedene photophysikalische Prozesse zu durchlaufen: Photoabsorption (Anregung), strahlende Übergänge (Fluoreszenz, Phosphoreszenz) und nicht-strahlende Übergänge (z.B. Energie- und Elektronen-Transfer). Daraus resultieren ihre photochemischen Eigenschaften, wie das Eingehen kovalenter Bindungen zu z.B. Nukleinsäuren (DNA, RNA) oder Proteinen, oder auch die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Boelsterli 2005, Cimino et al. 1985, Kitamura, Kohtani and Nakagaki 2005, Encyclopaedia Britannica 2010, Schmitt, Chimenti and Gasparro 1995).

2.5.5.1 Photophysik

Die photophysikalischen Eigenschaften von Furocumarinen treten durch die Absorption von Photonen im UV-Wellenlängenbereich (200-400 nm) zu Tage. Hier sind zwei elektronische Übergänge möglich: Erstens der Übergang des nicht-bindenden Elektrons der Carbonylgruppe in das antibindende π^* -Orbital ($n \rightarrow \pi^*$) und zweitens der eines Elektrons des bindenden π -Orbitals in das antibindende π^* -Orbital ($\pi \rightarrow \pi^*$); im Wesentlichen ist die Anregung der Furocumarine in deren Pyronteil lokalisiert. Die fluoreszierenden und phosphoreszierenden Zustände werden u.a. aufgrund ihrer Polarisationspektren und Lebensdauern dem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Anregungszustand zugeordnet. Aus diesem Zustand erfolgt neben der Fluoreszenz ein Intersystem Crossing (ISC) unter Spinumkehr in den $^3(n, \pi^*)$ -Zustand, der weiter in den $^3(\pi, \pi^*)$ -Zustand übergeht, aus dem Phosphoreszenz und weitere chemische Reaktionen erfolgen (Cimino et al. 1985, Kitamura et al. 2005, Song and Tapley 1979). Eine Übersicht gibt Abb. 2.5.5.1.

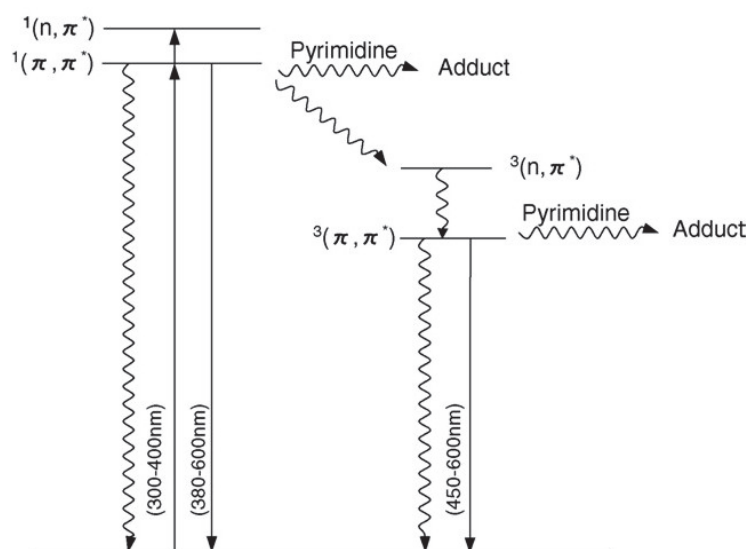


Abb. 2.5.5.1: Jablonski-Diagramm der Energie-Level angeregter Zustände des Psoralens (Kitamura et al. 2005)

Furocumarine fluoreszieren eher schwach, phosphoreszieren dagegen relativ stark. Typische Lebensdauern sind, abhängig von Lösungsmittel und Substituenten, 1-5 ns für den Singulett-Zustand (S_1), 1 μ s - 1 s für den Triplett-Zustand (T_1). Deswegen und aufgrund des effizienten ISCs ($\Phi_{ISC} \approx 0,5$) sind die Fluoreszenz-Quantenausbeuten

($\Phi_F = 0,01-0,02$) relativ gering im Vergleich zur Phosphoreszenz ($\Phi_P = 0,1-0,2$); daher finden die meisten Adduktbildungen an Thyminbasen (vgl. 2.5.5.2.1) aus dem T_1 -Zustand statt. Die Lebensdauer der S_1 -Zustände kann allerdings durch polare Lösungsmittel und e^- -schiebende Substituenten (z.B. Methyl- oder Methoxygruppen) verlängert werden, da hier der energetische Abstand zwischen $^1(n,\pi^*)$ - und $^1(\pi,\pi^*)$ -Zustand vergrößert und so die Wahrscheinlichkeit des strahlungslosen Übergangs verringert wird. Daher erfolgt die Adduktbildung entsprechend substituierter Furocumarine aus den S_1 -Zustand mit höherer Wahrscheinlichkeit als bei unsubstituierten. Da allerdings der postulierte Triplett-Zustand bei interkalierten Furocumarinen (noch) nicht nachgewiesen wurde und der S_1 -Zustand durch Interkalation gequencht wird, wird ebenfalls eine Reaktion aus dem Singulett-Zustand diskutiert (Kang, Shin and Shim 1992, Cimino et al. 1985, Kitamura et al. 2005, Mantulin and Song 1973, Serrano-Perez, Serrano-Andres and Merchan 2008b, Shim et al. 1987, Song and Tapley 1979).

2.5.5.2 Photochemie/-biologie

Nach der Absorption eines Photons geeigneter Wellenlänge sind Furocumarine in der Lage, aus ihren angeregten Zuständen heraus verschiedene chemische Reaktionen einzugehen. Darunter sind sauerstoffunabhängige kovalente Bindungen oder auch die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Im Folgenden soll auf die verschiedenen Mechanismen näher eingegangen werden (Bordin, Dall'Acqua and Guiotto 1991, Cimino et al. 1985, Kitamura et al. 2005, Musajo and Rodighiero 1972, Scott et al. 1976, Serrano-Perez, Merchan and Serrano-Andres 2008a, Tessman, Isaacs and Hearst 1985):

2.5.5.2.1 Kovalente Bindung an die Basen der DNA

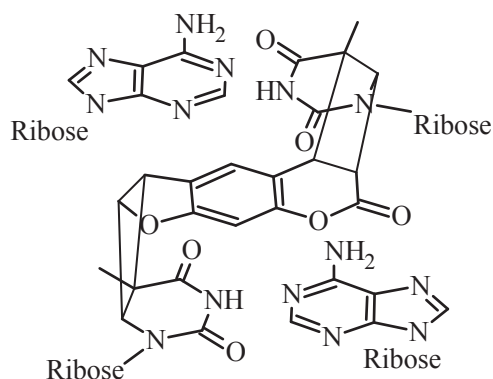
Die Ausbildung einer kovalenten Bindung von Furocumarinen an die Basen der DNA erfolgt in drei möglichen Schritten (vgl. Abb. 2.5.5.2.1b):

1. Die Furocumarinmoleküle, ebenso Limettin, interkalieren im Dunkeln zwischen benachbarte Basen der DNA-Helix unter Ausbildung eines nicht-kovalenten Komplexes, wobei komplexierte Moleküle mit den freien Furocumarinen im Gleichgewicht stehen. Hinweise in der Literatur auf die Ausbildung eines solchen Komplexes geben u.a. die Abnahme der Furocumarin-Absorption und die Rotverschiebung des Absorptionsmaximums in Gegenwart von doppelsträngiger DNA oder die Erhöhung des Schmelzpunktes und der Viskosität freier DNA in Gegenwart von Furocumarinen.
2. Die Absorption eines Photons geeigneter Wellenlänge (365 nm) induziert die Ausbildung eines Monoaddukts unter [2+2]-Cycloaddition eines Furocumarins an die Pyrimidinbasen der DNA. Hauptsächlich erfolgt die Addition an die 5,6-Doppelbindung des Thymins, selten an Cytosin; Purinbasen werden nicht angegriffen. Die an der Cycloaddition beteiligten Doppelbindungen sowohl linearer als auch angularer Furocumarine sind die 3,4-Doppelbindung des Pyronrings und die 4',5'-Doppelbindung des Furanrings. Auch wenn die photophysikalische Anregung des Moleküls hauptsächlich an der Pyron-Doppelbindung stattfindet, kommt es durch Ladungs-Umverteilung über das π -Elektronen-System zu einer erhöhten e^- -Dichte an der Furan-Doppelbindung, weshalb auch hier [2+2]-Cycloadditionen stattfinden. Im Allgemeinen wird bevorzugt das

4',5'-Monoaddukt gebildet, jedoch kann substituentenabhängig, wie z.B. bei 8-MOP, das 3,4-Monoaddukt in beträchtlichem Maße gebildet werden. Die dabei gebildeten Addukte sind meistens vom *cis-syn*-Typ; dabei bedeutet *syn* für das Furanring-Addukt, dass der Furan-O¹ und der Pyrimidin-N¹ an benachbarten Stellen des Cyclobutanrings zu finden sind, und für das Pyronring-Addukt, dass der Carbonyl-C² des Furocumarins und der Pyrimidin-N¹ benachbart liegen. Die bevorzugte Bildung dieses Stereoisomers ist ein weiterer Hinweis darauf, dass vor der Adduktbildung erst ein Komplex ausgebildet wurde. Weiterhin sind die Addukte nicht willkürlich verteilt, sondern treten bevorzugt in A/T-reichen Regionen (5'-TA-3') auf.

3. Nach Absorption eines zweiten Photons ist die Ausbildung eines Furocumarin-DNA-Crosslinks durch eine zweite [2+2]-CA möglich, wobei auch hier das *cis-syn*-Produkt gebildet wird. Dies gilt im Wesentlichen nur

für lineare Furocumarine, die das Furanring-Monoaddukt ausgebildet haben und am Pyron-Ring nicht sterisch gehindert sind. Da das 3,4-Monoaddukt nicht bei Wellenlängen > 320 nm absorbiert, kann es bei der üblichen UVA-Bestrahlung mit 365 nm nicht angeregt werden und somit nicht weiterreagieren. Das 4',5'-Monoaddukt hingegen absorbiert bei 365 nm und kann so eine weitere kovalente Bindung am Pyronring eingehen. Angulare



Furocumarine können generell aufgrund ihrer sterischen Struktur keine Crosslinks ausbilden, da sie mit der zweiten Doppelbindung nicht nahe genug an gegenüberliegende Pyrimidin-Basen gelangen. Ebenso bildet Limettin, dem die 4',5'-Doppelbindung gänzlich fehlt, und das Furanochromon Khellin über die 2,3-Pyron-Doppelbindung oder die 4',5'-Furan-Doppelbindung nur Monoaddukte aus (Chen and Kagan 1993, Morliere et al. 1988, Riccio et al. 1992, Trabalzini et al. 1990). Daher spricht man bei linearen Furocumarinen auch von bifunktionalen FCs, da ein Molekül zwei Bindungen zur DNA eingehen kann, bei angularen von monofunktionalen FCs, da nur die Bildung eines Monoaddukts möglich ist (Ashwood-Smith et al. 1983, Bordin et al. 1991, Cimino et al. 1985, Dall'Acqua et al. 1978, Eichman et al. 2001, Kitamura et al. 2005, Lai et al. 2008, Musajo and Rodighiero 1970, Rodighiero et al. 1970, Sage and Moustacchi 1987, Scott et al. 1976, Serrano-Perez et al. 2008a, Tessman et al. 1985, Peckler et al. 1982, Shim et al. 1987, Jung, Song and Harter 1983).

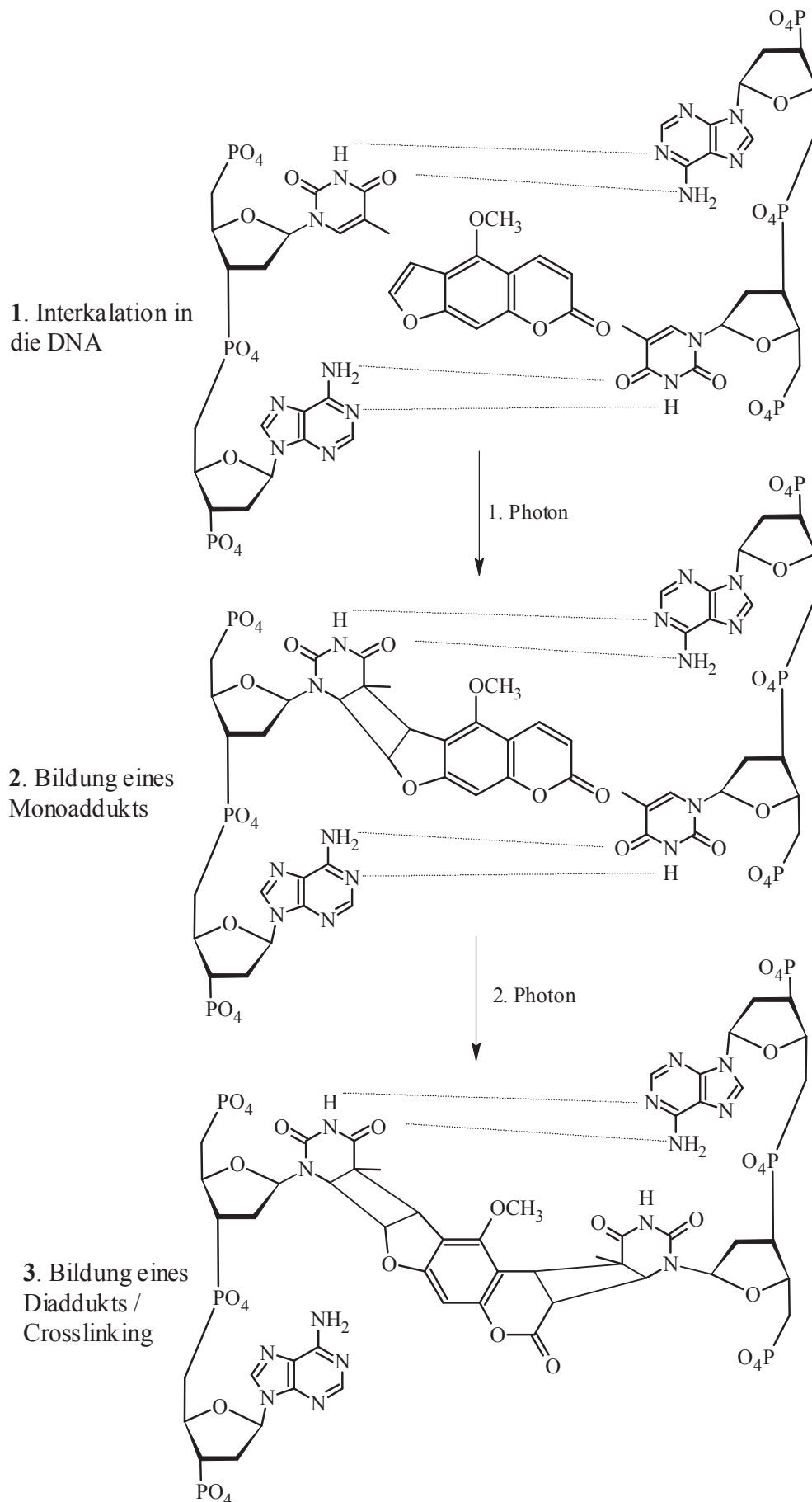


Abb. 2.5.5.2.1b: Mechanismus der photoinduzierten kovalenten 5-MOP-Thymin-Adduktbildung zwischen zwei komplementären DNA-Strängen

2.5.5.2.2 Kovalente Bindung an weitere Biomoleküle

Neben der oben beschriebenen kovalenten Bindungsbildung an Pyrimidinbasen (Thymin, Cytosin) der DNA können Furocumarine an weitere biologische Substrate kovalent binden. Dazu gehören u.a. die Pyrimidinbasen (Uracil, Cytosin) der RNA, aber auch Proteine und ungesättigte Fettsäuren, wie sie in der Zellmembran vorkommen.

Tatsächlich machen DNA-Addukte nur einen geringen Teil der Furocumarin-Addukte *in vivo* / *in vitro* aus, das Verhältnis RNA/DNA-Addukte beträgt sogar nur 1:10-100. So fanden Beijersbergen van Henegouwen et al. (1989) in fraktionierten Zellkomponenten der Rattenepidermis nach der Behandlung mit 8-MOP und UVA-Bestrahlung folgende Verteilung des gebundenen 8-MOPs: 17% an der DNA, 57% an Proteinen und 26% an Lipiden; eine ähnliche Verteilung konnte auch in humanen Lymphozyten gefunden werden.

Furocumarin-Protein-Bindung:

Auch wenn bisher kein Furocumarin-Protein-Photoaddukt isoliert wurde, konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass Addukte an Aminosäuren gebildet werden. So wurde gezeigt, dass photoaktiviertes 8-MOP kovalent an Lysozyme, bovines Serumalbumin, Histone, Ribonukleasen, Glutamatdehydrogenasen und *E.coli*-DNA-Polymerasen bindet. Diese Reaktionen finden, bis auf *E.coli*-DNA-Polymerase I, hauptsächlich in Gegenwart von Sauerstoff statt. Weiterhin sind aktivierte Furocumarine an der Photolyse einiger Aminosäuren wie Tryptophan, Methionin, Tyrosin und Histidin beteiligt. Lichtunabhängig können Furocumarine auch reversibel an Serumproteine (Albumine) und die Epidermis binden.

Furocumarin-Lipid-Bindung:

Die [2+2]-Cycloaddition angeregter Furocumarine findet analog zur DNA-Addition statt; involviert sind hier die 3,4-Doppelbindung ebenso wie die 4',5'-Doppelbindung des Furocumarins und die Doppelbindung ungesättigter Lipide, wie beispielsweise Ölsäure-, Elaidinsäure-, Linolsäure-, Linolensäure- oder entsprechende Methylester. *In vivo* liegen ungesättigte Fettsäuren als Glycylester in Phospholipiden wie Phosphatidylcholin oder Phosphatidylserin vor oder sind an membranständige Glycoproteine gebunden. Folglich findet die Addition vorrangig an diesen Molekülen statt an freien Fettsäuren (Artuc et al. 1979, Beijersbergen van Henegouwen et al. 1989, Bordin et al. 1991, Cadet, Vigny and Midden 1990, Dall'Acqua and Martelli 1991, Kitamura et al. 2005, Potapenko 1991, Schlatter 1988, Schmitt et al. 1995, Zarebska 1994, Zarebska et al. 1998).

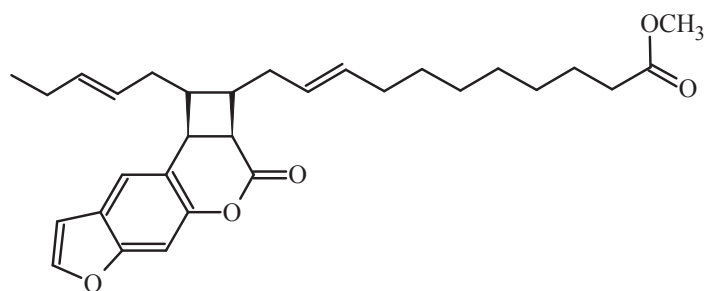


Abb. 2.5.5.2.2: Kovalente Bindung von Psoralen an Linolensäure-methylester

2.5.5.2.3 Photolyse / Dimerisierung

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Reaktionen können Furocumarine in Abwesenheit eines Substrates auch noch der Photolyse unterliegen. Dabei kommt es zu Dimerisierungen durch Reaktion eines angeregten FCs mit einem weiteren FC im Grundzustand, aber auch zur Bindung an das Lösungsmittel oder, bei Anwesenheit von Sauerstoff, auch zur Oxidierung eines Furocumarins.

Die Dimerisierung kann sowohl an der 3,4-Doppelbindung als auch der 4',5'-Doppelbindung sowohl angularer als auch linearer Furocumarine vonstatten gehen unter Bildung der verschiedenen Stereoisomere analog zu 2.5.5.2.1. Die Cyclisierungen an beiden 3,4-Doppelbindungen oder der 3,4- und der 4',5'-Doppelbindung werden relativ leicht eingegangen, wobei die an beiden 4',5'-Doppelbindungen nur bei Psoralen unter spezifischen Bedingungen bekannt ist (Caffieri 2002).

Die photochemische Addition des Lösungsmittels (Wasser, Ethanol, Methanol) findet am Furanring statt; im Falle von Wasser resultiert daraus eine Hydroxylierung an C^{5'} unter Verlust der Doppelbindung. Oxidierungen in Gegenwart von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie Singulett-Sauerstoff (vgl. 2.5.5.2.4), die von FCs selbst photochemisch gebildet werden können, finden sowohl an der 3,4-DB als auch an der 4',5'-DB statt, woraus eine Aldehydbildung unter Ringöffnung resultiert. Oxidative Additionen des Lösungsmittels, wenn auch nicht zwingend photochemischer Natur, können in einer Vielzahl weiterer Produkte resultieren.

Furocumarine, die leicht einer DNA-Komplexierung unterliegen, scheinen auch leicht eine Photolyse einzugehen, was das im Dunkeln eingestellte Gleichgewicht zwischen komplexierten und frei gelösten FCs beeinflusst (Caffieri 2002).

2.5.5.2.4 Reaktionen mit molekularem Sauerstoff

Die photodynamischen Reaktionen von Furocumarinen mit molekularem Sauerstoff finden aus dem angeregten Triplett-Zustand (T₁) statt und lassen sich in Mechanismen vom Typ I und Typ II unterteilen (Potapenko 1991, Serrano-Perez et al. 2008a, Pathak and Joshi 1984, Decuyper, Piette and Van de Vorst 1983, Epe 1991):

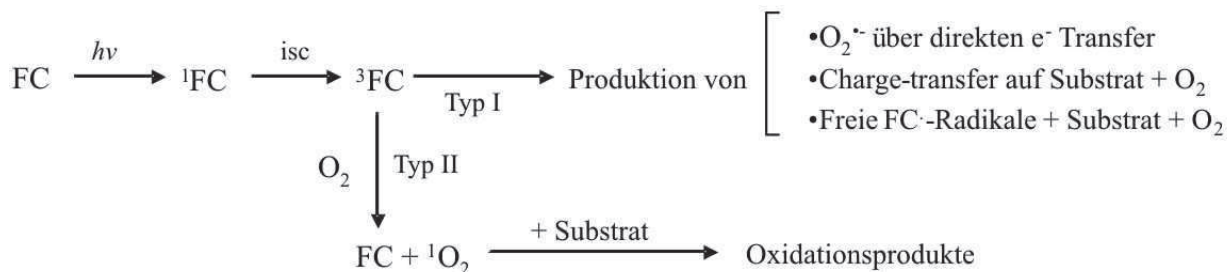
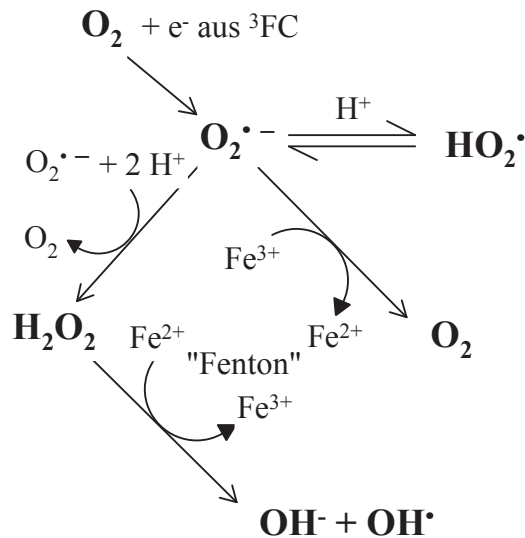


Abb. 2.5.5.2.4a: Mögliche Reaktionen von Furocumarinen mit O₂, mit FC = Furocumarin, hν = Photon bestimmter Energie, isc = Intersystem-Crossing, nach (Potapenko 1991)

Reaktionen vom Typ I entsprechen dem Ladungstransfer vom angeregten Furocumarin-molekül über drei mögliche Wege: Entweder über die Ausbildung eines Charge-Transfer-Komplexes mit dem Substrat und subsequenter Reaktion mit Sauerstoff, oder über Bildung freier Furocumarin-Radikale unter anschließendem Angriff auf das Substrat unter Sauerstoffbeteiligung, oder aber über den direkten Elektronen-Transfer auf molekularen



Sauerstoff, was in der Bildung von Superoxidradikalanionen resultiert. Diese können in biologischen Systemen zu Hydroperoxidradikalen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen weiterreagieren (vgl. Abb. 2.5.5.2.4b) und werden allgemein als reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species). Auf die Bildung von Peroxynitrit oder hypochloriger Säure wird hier nicht näher eingegangen (Aboul-Enein et al. 2003, Berg et al. 2007, Dean et al. 1997, Klotz, Kroncke and Sies 2003, Liochev and Fridovich 1994, Marnett, Riggins and West 2003, Potapenko 1991).

Abb. 2.5.5.2.4b: ROS aus Reaktionen vom Typ I

Reaktionen vom Typ II entsprechen dem Energietransfer vom angeregten Furocumarin im Triplett-Zustand (T_1) auf molekularen Sauerstoff (O_2), der so in den Singulett-Zustand angeregt wird. Normalerweise liegt Sauerstoff wie sonst nur wenige andere Moleküle in seinem Grundzustand im Triplett-Zustand (${}^3\text{O}_2$) vor und ist daher aufgrund des Spinerhaltungssatzes in chemischen und biologischen Oxidationsprozessen relativ reaktionsträge. Wird er jedoch in einen Singulett-Zustand (${}^1\Delta_g$ oder ${}^1\Sigma_g^-$, der allerdings für weitere Reaktionen zu kurzlebig ist und auch nur in der Gasphase entsteht) über einen Energieübertrag von einem Photosensibilisatormolekül angeregt, gilt dieses Spinverbot nicht mehr. Mit einer Halbwertszeit im Gewebe von 0,5-2 μs und einem maximalen Diffusionsradius von 0,1 μm kann er mit verschiedenen Biomolekülen wie Nukleosiden (DNA), Aminosäuren (Protein) oder Lipiden reagieren (Adam 1981, Davies 2003, Epe 1991, Liu et al. 1999, Marquardt and Schäfer 2004).

Reaktionen von ROS mit DNA-Basen:

Singulett-Sauerstoff reagiert sowohl mit freien Nukleosiden als auch mit den Nukleinbasen der DNA, wobei fast ausschließlich Guanin angegriffen wird. Abb. 2.5.5.2.4c zeigt die wichtigsten Reaktionsprodukte:

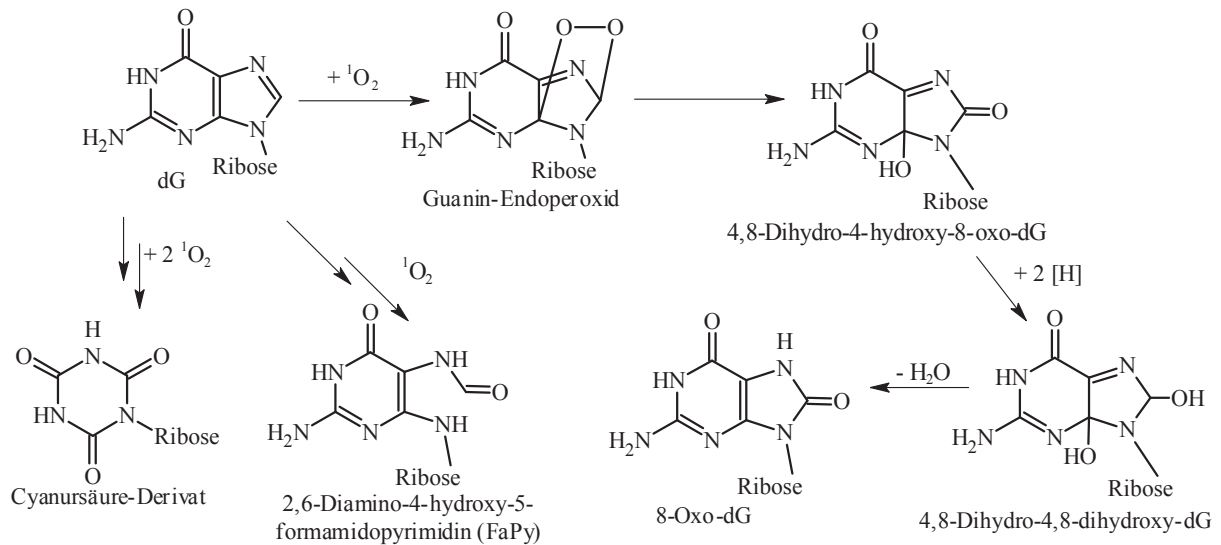


Abb. 2.5.5.2.4c: Reaktionsprodukte von Desoxyguanosin (dG) mit Singulett-Sauerstoff, nach (Marnett et al. 2003, Piette 1991, Sies and Menck 1992)

Das Superoxidradikalanion ist genau wie Peroxidradikale oder Wasserstoffperoxid selbst nicht in der Lage, die DNA anzugreifen. Dennoch entstehen Schäden aus dem daraus resultierenden Hydroxylradikal. Aufgrund seiner sehr kurzen Lebensdauer (10^{-9} s) ist davon auszugehen, dass es direkt an der DNA aus H_2O_2 entsteht. Im Vergleich zu $^1\text{O}_2$ ist HO^\bullet deutlich unspezifischer und induziert Hydroxylierungen, Ringöffnungen und Fragmentierungen sowohl an Purin- als auch Pyrimidinbasen, Inter- und Intra-Strand-Crosslinks und Strangbrüche durch Schäden am Zucker-Phosphat-Rückgrat. Ein bekanntes Beispiel ist die Hydroxylierung von Guanin am C^8 (Liu et al. 1999, Epe 1991, Halliwell and Gutteridge 1999, Kelly et al. 1998, Marnett et al. 2003, Piette 1991, Sies and Menck 1992, Termini 2000, Wang 2008, Orimo et al. 2006).

Reaktionen von ROS mit Aminosäuren und Proteinen:

Modifikationen von Polypeptiden durch ROS können am Peptid-Rückgrat, verschiedenen nucleophilen und redox-sensitiven Seitenketten stattfinden. Am Peptid-Rückgrat kann es durch Wasserstoff-Abstraktion am α -C-Atom und Folgereaktionen sowohl zur Quervernetzung durch Radikalkopplung als auch zur Peptidspaltung durch Einführung von Carbonylgruppen kommen. Unter physiologischen Bedingungen werden selektiv die Aminosäuren (AS) Tryptophan, Tyrosin, Histidin, Methionin, Cystein, Cystin und Phenylalanin direkt oxidiert; diese ungesättigten und schwefelhaltigen Verbindungen weisen die von ROS bevorzugte Nucleophilie auf. Allerdings können durch Folgereaktionen auch andere AS oxidiert werden (Marquardt and Schäfer 2004, Halliwell and Gutteridge 1999, Klotz et al. 2003, Marnett et al. 2003).

Reaktionen von ROS mit Lipiden:

Die Lipid-Peroxidation (LPO) kann sowohl durch Singulett-Sauerstoff als auch radikalische ROS und H_2O_2 ausgelöst werden. Durch Einwirkung von $^1\text{O}_2$ auf Lipid-Doppelbindungen entstehen charakteristische Additionsprodukte mit Verschiebung der DB in Allylstellung. Radikalische ROS können sogar Kettenreaktionen induzieren, da durch die geringe Bindungs-Dissoziations-Energie der bis-allylischen H-C-Bindungen der ungesättigten Fettsäuren sehr leicht ein H-Atom abgespalten werden kann, wodurch hoch

reaktive Lipid-Radikale entstehen (Initiation). Diese greifen wiederum molekularen O₂ an und bilden so Peroxyl-Radikale, die wiederum H-Atome weiterer Fettsäuren abspalten (Propagation). Die Kettenreaktion wird durch den verfügbaren Sauerstoff limitiert und durch Radikalfänger oder Reaktion der Alkoxy- und Peroxyl-Radikale untereinander abgebrochen (Termination). Wichtige Targets sind dabei u.a. membranständige Phospholipide oder Cholesterol. Mit der LPO sind Cyclisierungsreaktionen verbunden, wodurch aus den Fettsäuren Endoperoxide entstehen, die anschließend fragmentieren und so verschiedenste Moleküle entstehen, welche auch zytotoxische oder gentoxische Wirkungen besitzen, wie Malondialdehyd (MDA) (Belitz, Grosch and Schieberle 2008, Girotti 1990, Halliwell and Gutteridge 1999, Kelly et al. 1998, Marnett 1999, Marnett et al. 2003, Marquardt and Schäfer 2004).

2.5.5.3 Effekte auf den Organismus

Aufgrund der unter 2.5.5.2 beschriebenen Reaktionen in Kombination mit UVA-Licht, wie DNA-Adduktbildungen und DNA-Modifikationen, Generierung von ROS oder Veränderungen von Proteinen und Lipiden, sind für Furocumarine u.a. folgende adverse Effekte auf den Organismus beschrieben worden. Davon stehen einige Wirkungen in engem Zusammenhang mit der Blockade der DNA-Reparatur oder DNA-Synthese, Blockade der Zellteilung oder sogar Apoptose (Bonamonte et al. 2010):

Gentoxizität / Mutagenität:

Infolge der kovalenten Bindungsbildung (Monoaddukte und Crosslinks) von z.B. 5-MOP und 8-MOP an die DNA durch UVA-Licht (Papadopoulos and Averbeck 1985) konnten von verschiedenen Autoren Mutationen, z.B. in *E. coli*, V79-Zellen und CHO-Zellen (Tamaro et al. 1986, Loveday and Donahue 1984) oder Schwester-Chromatid-Austausche in CHO-Zellen (Loveday and Donahue 1984, Natarajan et al. 1981) gezeigt werden. Generell handelt es sich bei den von Furocumarinen induzierten Mutationen um hauptsächlich in AT-reichen Target-Regionen gelegenen A:T→T:A-Transversionen, weiterhin um A:T→C:G-Transversionen und A:T→G:C-Transitionen. Weniger präsent sind Modifikationen am Cytosin oder Deletionen. Im Allgemeinen finden sich Mutationen häufiger am nicht-transkribierten Strang, da Modifikationen am transkribierten Strang bevorzugt repariert werden (Chiou and Yang 1995, Besaratinia and Pfeifer 2004, Sage, Drobetsky and Moustacchi 1993, Sage and Bredberg 1991).

In vitro zeigten Kersten et al. in V79-Zellen ein massives Auftreten von Mikrokernen nach Applikation von 5-MOP, 8-MOP oder Angelicin und Kombination mit UVA-Licht (Kersten et al. 2002, Kersten et al. 1999).

In vivo konnten Mikrokerne nach oralen Dosen von 8-MOP (300 und 600 mg/kg) oder topischer Applikation in peripheren Erythrozyten in Mäusen ebenso wie in primären humanen Hautfibroblasten nachgewiesen werden (Hara et al. 2007, Stivala et al. 1995). Zudem konnte in epidemiologischen Studien ein Zusammenhang zwischen Chromosomenmutationen und einer erhöhten Krebsprävalenz festgestellt werden (Heim, Johansson and Mertens 1989, Oshimura and Barrett 1986, Pathak 1990, Smerhovsky et al. 2002, Peritz and Gasparro 1999). Weiterhin konnte die Induktion von Apoptosen in z.B. HL-60 Leukämie-Zellen bei der Überlastung der zelleigenen Reparatursysteme gezeigt werden (Viola et al. 2004).

Kanzerogenität am Tier:

Nach topischer Applikation an Albinomäusen von 5-MOP, 8-MOP und Psoralen in Kombination mit UVA-Strahlung wurden hauptsächlich Basalzellkarzinome induziert (Zajdela and Bisagni 1981). In haarlosen Mäusen konnten in einer analogen 5-Wochen-Studie mit 5-MOP Papillome nachgewiesen werden (Cartwright and Walter 1983). Ebenso wurden nach Applikation von 5-MOP und 8-MOP Hauttumoren in haarlosen Albinomäusen induziert (Young et al. 1983).

Beobachtete Effekte am Menschen:

Viele Studien und Fallstudien akuter phototoxischer Effekte wie Erytheme, Ödeme und/oder Bläschenbildung der Haut, ausgelöst von Furocumarinen in Kombination mit UVA-Licht, wurden bisher veröffentlicht. Sie finden sich sogar in Märchen wie dem kleinen Muck, der nach dem Verzehr von Feigen an einer Photodermatitis leidet (Scott et al. 1976). Wissenschaftlich dokumentierte Fälle der Photodermatitis sind z.B. Erytheme und Ödeme nach oraler Einnahme von 50 mg 8-MOP in Kombination mit Sonnenlicht (Fitzpatrick and Pathak 1984), Rötungen, Ödeme und Blasen nach dem Verzehr von 450 g Sellerie (geschätzte FC-Gesamtmenge: 45 mg) und anschließender Benutzung eines Solariums (Ljunggren 1990) oder Erytheme und Bläschen an den Händen von Feldarbeitern, die Kontakt zu u.a. mikrobiell infiziertem Sellerie hatten (Austad and Kavli 1983, Berkley et al. 1986). Auch nach Kontakt mit dem Saft des Feigenbaums in Kombination mit Sonnenlicht konnten solche Effekte beobachtet werden (Bonamonte et al. 2010). Die Schwellendosis oral aufgenommener Furocumarine in Kombination mit UVA-Licht zur Auslösung von Erythemen liegt bei etwa 14 mg 8-MOP (0,23 mg/kg KG) bzw. 10 mg 8-MOP + 10 mg 5-MOP (0,13 + 0,13 mg/kg KG) oder 15 mg „8-MOP-Äquivalenten“ (0,25 mg/kg KG) (Brickl et al. 1984, Schlatter et al. 1991).

Der Großteil der verfügbaren Informationen zu Phototoxizität am Menschen konnte aus der PUVA-Therapie (vgl. 2.5.6) gewonnen werden; in diesem Zusammenhang sind z.B. Fälle von photoallergischen Reaktionen (dyshidrotische Ekzeme, Erytheme, Papulovesikel) mit 8-MOP beschrieben (Korffmacher et al. 1994). Schlatter (1988) schätzte, dass die UVA-Dosis, welche in der Mittagszeit in 5-30 min die Haut erreicht, der in der PUVA-Therapie eingesetzten entspricht (vgl. 2.3).

Die schwerwiegendsten Effekte, die durch FCs + UVA auch beim Menschen auftreten, sind die erhöhte Inzidenz von Hauttumoren, weshalb 8-MOP in Kombination mit UVA-Licht auch als Kanzerogen der Klasse 1, 5-MOP + UVA-Licht der Klasse 2A eingestuft wurden (IARC 1986). Bei den in PUVA-Follow-Up-Studien verzeichneten Hauttumoren handelt es sich um Plattenepithelkarzinome, Basalzellkarzinome und Melanome, aber auch um Genitaltumoren, die sowohl auf die kovalente Bindung von FCs an DNA als auch auf ROS durch die Generierung clastogener Faktoren (d.h. Faktoren, die Chromosomenbruchstücke induzieren, vgl. 2.6.3.4) zurückzuführen sind (Nijsten and Stern 2002, Stern, Bagheri and Nichols 2002, Stern 1998, Stern, Liebman and Vakeva 1998, Stern 2001, Emerit 1994, Youssefi et al. 1994).

2.5.6 Anwendungen von Furocumarinen / PUVA-Therapie / ECP

Schon seit 2000-1200 v. Chr. sind den alten Ägyptern, Hindi, Türken und anderen orientalischen Völkern frühe Formen der Photochemotherapie bekannt, bei der Patienten Extrakte furocumarinhaltiger Pflanzen zur Behandlung von Hautkrankheiten dermal oder oral verabreicht wurden. So wurden zur Behandlung von Leukoderma (Vitiligo) in Ägypten Extrakte der Knorpelmöhre (*Ammi majus*) und in Indien Bawachi / Psoralea (*Psoralea corylifolia*) mit anschließender Sonnenlicht-Exposition eingesetzt. Ibn El Bitar beschrieb im 13. Jahrhundert in seinem Buch „Mofradat El Adwiya“ ebenfalls den Einsatz der Knorpelmöhre in Kombination mit Sonnenlicht zur Behandlung von Vitiligo. Doch erst 1834 konnte von Kalbrunner 5-MOP aus Bergamottöl isoliert und weitere 100 Jahre später von Späth und Holzen seine Struktur aufgeklärt werden.

Die moderne Form der PUVA-Therapie (Psoralen + UVA) existiert seit den frühen 1970er Jahren. Hier werden Psoralen, 5-MOP, 8-MOP oder Trimethylpsoralen (TMP) als Reinsubstanzen in Kombination mit UVA-Licht in der Behandlung von cutaner Hyperproliferation (Psoriasis), Vitiligo, Ekzemen oder Frühstadien von T-Zell-Lymphomen eingesetzt. Die Applikation erfolgt dabei topisch (Bade-PUVA oder in Cremes) oder oral, seltener intravenös oder rektal, wobei hier die unter 2.5.3.2 beschriebene Pharmakokinetik eine große Rolle spielt. In der Regel erfolgt die Bestrahlung bei oraler Gabe nach 2 h. Typische Dosen in der PUVA-Therapie sind 500-600 µg/kg KG 8-MOP oder 1200 µg/kg KG 5-MOP in Kombination mit 0,5-7 J/cm² UVA-Licht (315-400 nm, λ_{max} =355 nm).

Die Effekte der PUVA-Therapie sind Repigmentierung der depigmentierten Hautstellen (Vitiligo) oder Reduktion der Proliferation (Psoriasis und T-Zell-Lymphome), wobei bis heute noch nicht vollständig geklärt ist, auf welchem Mechanismus der Erfolg der PUVA-Therapie beruht, da FCs im gleichen Gewebe unterschiedliche Effekte auf verschiedene Zelltypen haben. Relevante Faktoren sind dabei die Ausbildung von DNA-Crosslinks und somit Modifikation der Genexpression und zellulären Prozessen, Modifikationen von Proteinen und Membranen durch kovalente Bindung oder ROS oder die Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren, infolgedessen z.B. eine Bindung des Epidermal Growth Factors an seinen Rezeptor verhindert wird und so das Zellwachstum beeinflusst wird, oder auch Apoptose und Nekrose. Der limitierende Faktor bei der PUVA-Therapie ist das erhöhte Hautkrebsrisiko.

Auch das Furanochromon Khellin wird häufig in der sog. KUVA-Therapie (Khellin + UVA) analog zu Psoralenen zur Behandlung von Vitiligo eingesetzt, führt dabei aber nicht zu sichtbaren phototoxischen Effekten wie Erythemen, sondern nur zu Repigmentation der Haut (Ortel, Tanew and Honigsman 1988).

Eine Sonderform der PUVA-Therapie ist die Extrakorporale Photopherese (ECP) zur Behandlung T-Zell-vermittelter Krankheiten wie T-Zell-Lymphomen oder Lupus erythematosus. Hierbei wird nach oraler Gabe von 8-MOP Blut entnommen, fraktioniert, die Lymphozyten-Fraktion mit UVA-Licht bestrahlt und in den Körper zurückgeführt. Dies führt zu einer Immunmodulation, die den pathogenen T-Zell-Klon unterdrückt bzw. die Apoptose von T-Zellen induziert (Scott et al. 1976, Pathak and Fitzpatrick 1992, Stern et al. 1998, Shephard et al. 2001, Laskin 1989, Morita et al. 1997, McEvoy and Stern 1987, Bech-Thomsen et al. 1992, Lowe et al. 1987, Laskin 1994, van Iperen and Beijersbergen van Henegouwen 1997, Kitamura et al. 2005, Schlatter 1988, SKLM 2006).

2.5.7 Bewertung von Furocumarinen

Auch wenn Furocumarine (8-MOP, 5-MOP) als Humankanzerogene der Klasse 1 bzw. 2A aufgrund der aus Follow-Up-Studien zur PUVA-Therapie gewonnenen Daten eingestuft wurden und somit das ALARA-Prinzip verfolgt werden sollte, wird für Furocumarine als Komponenten von Nahrungsmitteln und pflanzlichen Medikamenten die Festlegung eines Schwellenwerts für phototoxische Effekte verfolgt. Zum einen wurden Schwellendosen für phototoxische Effekte am Menschen wie Erytheme oder Bläschenbildung gezeigt, zum anderen wird eine Schwellendosis als „practical threshold“ für ein zusätzliches Krebsrisiko diskutiert, was aus folgenden Gründen gerechtfertigt ist:

- Die Extrapolation erfolgte von hohen zu niedrigen Dosen um den Faktor 100-1000 (Tierexperiment) bzw. den Faktor 30 (Therapeutische Dosis Mensch) unter der Annahme eines linearen Zusammenhangs.
- die Kombination FC + UVA ist nicht die alleinige Ursache für eine erhöhte Tumorinzidenz bei der PUVA-Therapie. Wolf et al. (2004) untersuchten das Mutationsspektrum in Keratosen von PUVA-behandelten Psoriasis-Patienten und fanden häufig Mutationen im *p53*- und *Ha-ras*-Gen. Davon wurden 56% (*p53*) bzw. 72 % (*Ha-ras*) an Dipyrimidin-Stellen gefunden, womit direkt UV-Licht ohne Photosensitizer verantwortlich ist und nur 33% (*p53*) bzw. 11 % (*Ha-ras*) der Mutationen auf PUVA zurückzuführen sind. Seidl et al. (2001) führten 69% der *p53*-Mutationen in Basalzellkarzinomen auf UV-Strahlung zurück.
- Phototoxische Effekte wie Erytheme scheinen, zumindest für potente Phototoxine, eine Grundvoraussetzung für Gentoxizität und Kanzerogenität zu sein oder zumindest findet sich eine enge Korrelation zwischen DNA-Schädigungen und Erythemen, wofür Schwellendosen beobachtet wurden.
- Beim Menschen wurde ein hepatischer sättigungsfähiger First-Pass-Effekt beobachtet, weshalb zum Erreichen messbarer FC-Plasma-Level eine gewisse Aufnahmemenge überschritten werden muss.
- Generell finden sich *in vivo* einige Faktoren, die eine Threshold Dose für DNA-Alkylantien rechtfertigen, wie den Kern abschirmende Membranen, metabolisierende Enzyme, DNA-Reparatur, apoptoseauslösende Mechanismen oder redundante, nicht codierende oder regulierende DNA-Sequenzen.

Weiterhin finden sich in der Literatur zu Bewertungen von Furocumarinen und Erhebungen zur Aufnahme/Verzehr nur Angaben zur Gesamt-Furocumarin-Menge, von denen in einem Worst-Case-Szenario die gleiche phototoxische Potenz wie die des ausführlich untersuchten 8-MOP angenommen wird. Somit kann z.B. beim Übertragen der von Brickl et al. (1984) bzw. Schlatter et al. (1991) gefundenen phototoxischen Schwellendosis von 14 mg bzw. 15 mg 8-MOP (0,23 bzw. 0,25 mg/kg KG) auf 14 mg bzw. 15 mg Gesamt-Furocumarinmenge das tatsächliche Risiko überschätzen. Dennoch kann u.a. aufgrund der Gentoxizität von FCs oder der Tatsache, dass z.B. in subchronischen Studien bei Hunden 48 mg/kg KG/Tag noch hepatotoxisch wirkten oder 6 mg/kg KG/Tag 8-MOP bei Affen noch zu Erbrechen führten, kein NOEL für wiederholte Aufnahme festgelegt werden.

Erhebungen zur Aufnahme von Furocumarinen über Lebensmittel schätzten die tägliche FC-Aufnahme auf 1,3 mg (USA), 1,45 mg (Deutschland) oder max. 1,2 mg (Großbritannien), entsprechend 0,020-0,023 mg/kg KG (Wagstaff 1991, SKLM 2006, COT 1996). Nach Wagstaff (1991) tragen Limetten zu 97 % zur täglichen Aufnahme bei

unter der Annahme, dass deren zur Aromatisierung von Getränken verwendetes Öl kaltgepresst ist und FCs enthält. Nach Gorgus et al. (2010) finden sich allerdings in Limonaden keine FCs, weswegen unter weiterer Berücksichtigung aktualisierter Verzehrsstudien die tägliche Aufnahme von der SKLM (2010) auf 0,56 mg geschätzt wird. Dieser Wert liegt um den Faktor 30 unter der phototoxischen Schwellendosis, womit kein Risiko des Auftretens phototoxischer Wirkungen erkennbar ist.

Problematisch sind allerdings Akutexpositionen, wie sie z.B. durch den Verzehr größerer Mengen unsachgemäß gelagertem und mikrobiell infiziertem Sellerie (vgl. 2.5.1) entstehen können, da hier FC-Mengen von 50 mg erreicht werden können, welche die phototoxische Schwellendosis überschreiten.

Weiterhin stellen Kleinkinder eine Risikogruppe dar, nicht nur aufgrund ihrer erhöhten Verzehrsmenge pro kg KG. In den letzten Jahren sind Babybreie aus Pastinaken sehr beliebt geworden, sowohl aus dem Glas, in denen bis zu 13 mg/kg FCs gefunden wurden, als auch selbstgekocht. Bei der Verwendung von frischen Pastinaken besteht keine Gefahr, werden jedoch unsachgemäß gelagerte benutzt (bis zu 50 mg/kg FCs), können phototoxische Effekte auftreten. Unter der Annahme, dass einem Kleinkind von 7 kg KG 200 g Brei gefüttert werden, entspricht dies einem Verzehr von 0,36 mg/kg KG bzw. bis zu 1,5 mg/kg KG, was die phototoxische Schwellendosis von ca. 0,25 mg/kg KG deutlich überschreitet. Zudem werden Furocumarine nicht durch Kochen allein zerstört, sondern offenbar nur durch Anwesenheit von Säure, weshalb sich so keine Risikominimierung erzielen lässt. Insgesamt ist allerdings zu schließen, dass die tägliche über die Nahrung aufgenommene Furocumarinmenge, die sich deutlich unter der minimalen phototoxischen, also z.B. erytheminduzierenden, Dosis befindet, kein signifikantes zusätzliches Risiko für eine Hautkrebserkrankung darstellt (Autier et al. 1997, Berkley et al. 1986, EuropeanCommission 2000, Gorgus et al. 2010, Guth 2006, Ivie et al. 1981, Schlatter 1988, Schlatter et al. 1991, SKLM 2006, SKLM 2010, Wagstaff 1991, HMPC 2007, IARC 1986, FDA 2003, Winterhoff 2007, Wolf et al. 2004, Brickl et al. 1984, COT 1996, Ljunggren 1990, Uesawa and Mohri 2006, Loveday 1996, Eisenbrand 2007, Marrot and Meunier 2008, Jenkins et al. 2005, IARC 1980).

2.6 Methodische Grundlagen

2.6.1 V79-Zelllinie

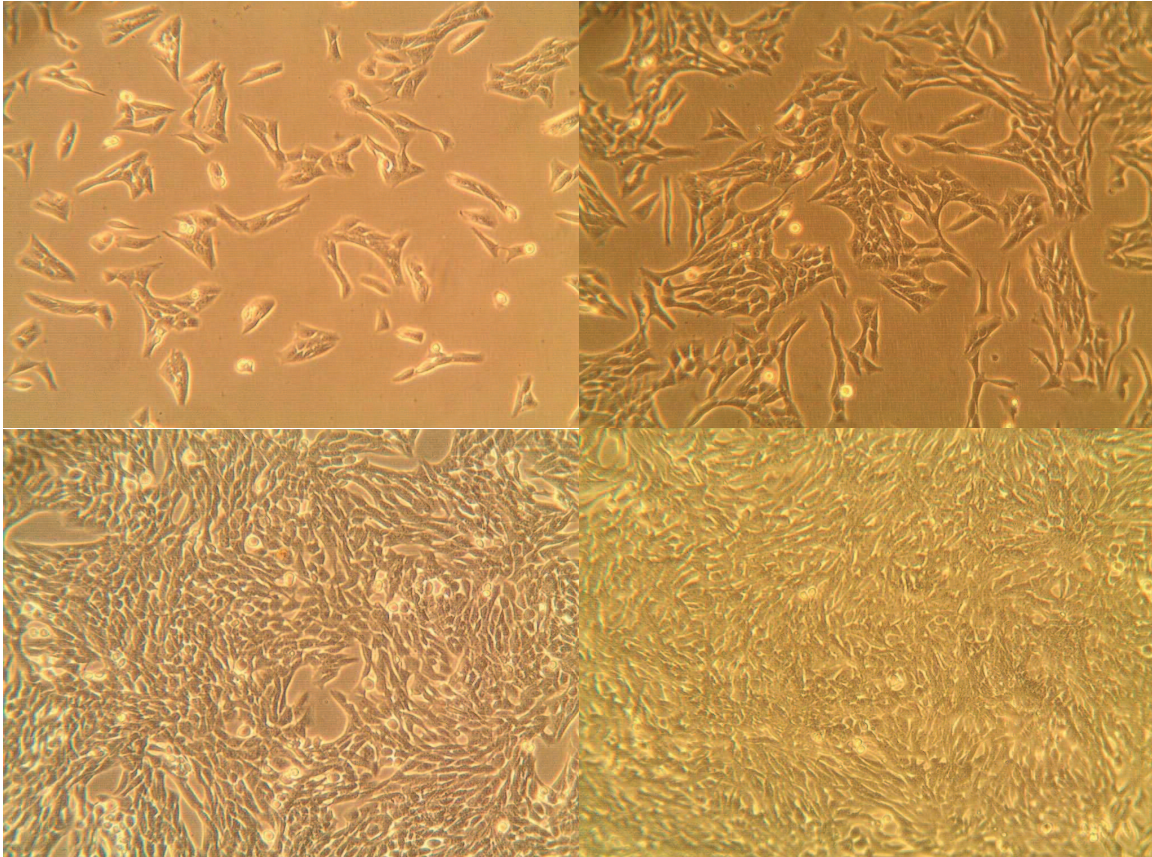


Abb. 2.6.1: V79-Zellen, lichtmikroskopische Abbildungen verschieden dicht gewachsener Monolayer, Vergrößerung des Mikroskops: 10 x 40

Die V79-Zelllinie wurde 1958 von Ford und Yerganian aus der Lunge eines männlichen Chinesischen Hamsters isoliert. Die Zellen verfügen über einen vergleichsweise stabilen und homogenen Karyotyp mit einer modalen Chromosomenzahl von 21 ± 1 . Bei den heute benutzten Zellen handelt es sich um Klone oder Subklone dieser isolierten Fibroblasten, die allerdings nicht notwendigerweise identische Karyotypen aufweisen, weswegen direkte Vergleiche nur unter Vorbehalt möglich sind. Die Zellen zeichnen sich durch eine hohe Kloniereffizienz (50-100%), kurze Verdopplungszeit (12-16 h) und reproduzierbare Charakteristik, z.B. geringe spontane Mutationsfrequenz, aus, erholen sich schnell von der Kryokonservierung und beginnen mit dem exponentiellen Wachstum auch bei geringen Aussaatdichten, was sie für Mutagenitätsassays äußerst interessant macht (Glatt 1993, Krahn 1983, Ford and Yerganian 1958, Bradley et al. 1981).

Allerdings exprimieren V79-Zellen unter normalen Kulturbedingungen gar keine Cytochrome P450, weshalb zur Mutagenitätstestung von Substanzen, die ihre mutagene Wirkung erst über reaktive Metaboliten entfalten, ein zusätzliches Stoffwechselsystem eingesetzt werden muss. Möglich ist hier der Einsatz eines S9-Mix, gewonnen z.B. aus einer Aroclor-induzierten Rattenleber, einer Ko-Kultur mit frisch isolierten Hepatozyten oder der Einsatz genetisch modifizierter V79-Zellen, die CYPs stabil exprimieren

(Doehmer 1993, Doehmer and Oesch 1991, Glatt 1993, Krahn 1983, Philip et al. 1999). Dennoch sind V79-Zellen sehr wohl in der Lage, andere am Fremdstoffmetabolismus beteiligte Enzyme teilweise in hohem Maße zu exprimieren, darunter Cytochrom P450-Reduktase, mikrosomale Epoxidhydrolase, Glutathion-S-Transferase, *N*-Deacetylase oder Acetyltransferase, wobei deren Aktivitäten laborspezifisch um mehrere Größenordnungen variieren können. Weiterhin sind V79 Zellen O⁶-Methyl-Guanin-Methyltransferase (MGMT)-defizient und können demnach promutagene O⁶-Methyl-Guanin-DNA-Addukte nicht reparieren (Glatt 1993, Yarosh 1985).

Darüber hinaus exprimieren V79-Zellen Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT, vgl. 2.6.2), was sie ebenfalls für Vorwärts-Mutationsassays interessant macht, da das *hprt*-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, weshalb nur eine aktive Kopie vorliegt. Dies ist wichtig, da der Phänotyp mit keiner oder geringer HPRT-Aktivität bei mehr als einer aktiven Kopie rezessiv ist und somit Mutationen an nur einem Allel nicht detektiert werden (Bradley et al. 1981, Glatt 1993).

2.6.2 Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)

Die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) oder auch Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) spielt eine wichtige Rolle bei der Purin-Nukleotid-Biosynthese, die generell auf zwei Arten vonstatten gehen kann: Erstens über die *de novo*-Synthese, bei der die entsprechende Nucleotidbase aus verschiedenen einfachen Bausteinen synthetisiert wird, die allerdings energetisch ungünstiger ist; hier wird die Purinbase stückweise an der Riboseinheit unter ATP-Verbrauch aufgebaut (Berg et al. 2007, Michael 1999).

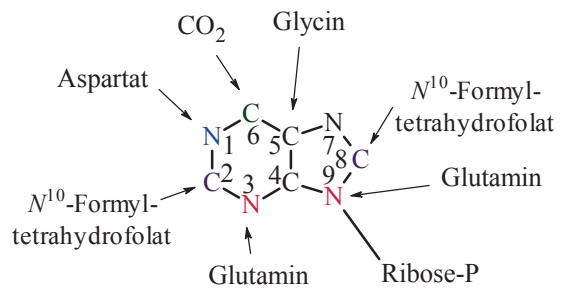


Abb. 2.6.2a: Herkunft der Atome im Purinring bei der *de novo*-Synthese

Die zweite und energie günstigere Möglichkeit ist über den *salvage pathway*, bei dem ganze Basen wiederverwertet und mit Hilfe der HPRT in einem Recyclingschritt eine Riboseinheit an Hypoxanthin oder Guanin gekoppelt wird, woraus Inosinat (IMP, Inosinmonophosphat, Vorstufe von Guanylat oder Adenylat) oder Guanylat (GMP) unter Pyrophosphat-Abspaltung entstehen:

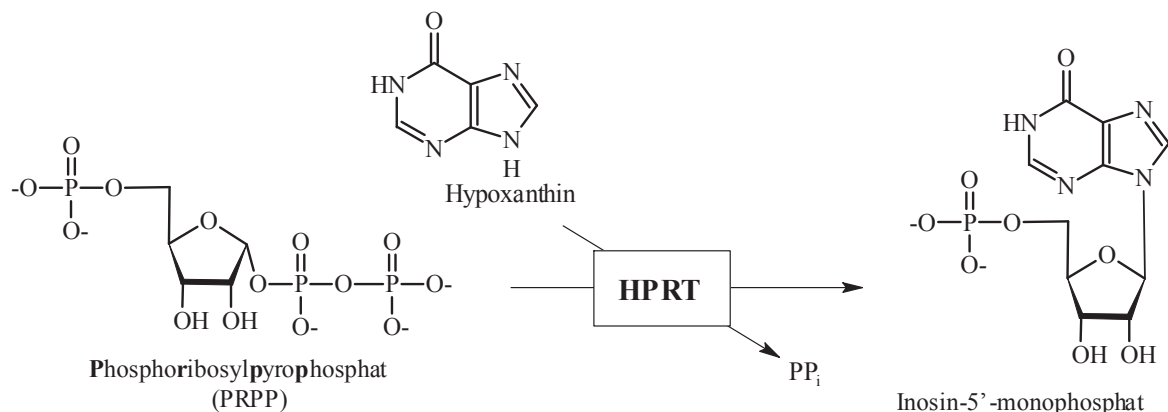


Abb. 2.6.2b: HPRT-katalysierte Bildung von Purinnukleotiden am Beispiel von Hypoxanthin

Zusätzlich zu Hypoxanthin oder Guanin kann die HPRT auch als Antimetaboliten wirksame Purinanaloga wie 6-Thioguanin oder 8-Azaguanin an PRPP koppeln. Diese Nukleotide können nun in die DNA oder RNA eingebaut werden, was zu Störungen in deren Struktur und schließlich zum Zelltod führt. Bei HPRT-defizienten Zellen können diese toxischen Nukleotide nicht gebildet werden, wodurch sie resistent werden.

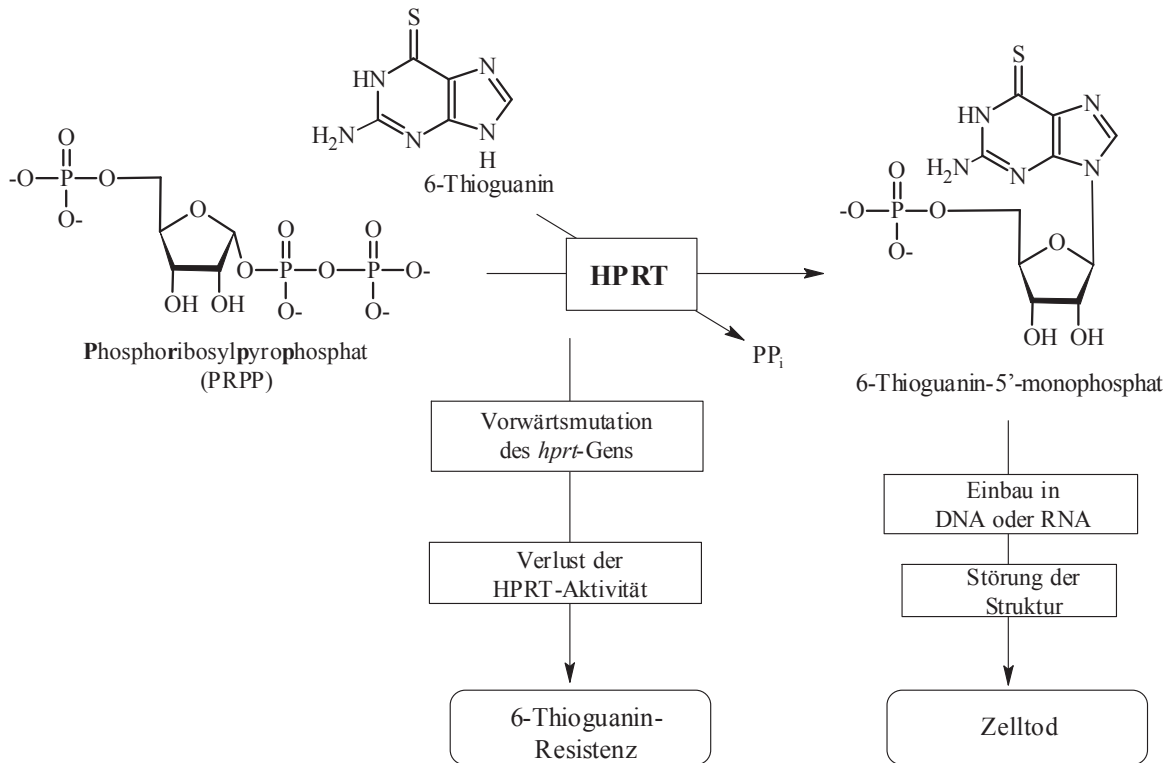


Abb. 2.6.2c: Prinzip des HPRT-Genmutationsassays

Drei Faktoren tragen dazu bei, dass der HPRT-Genmutationsassay ein derart wichtiges Testsystem in der Mutagenitätsforschung an Säugerzellen wurde:

1. Das *hpert*-Gen ist bei Säugetieren auf dem X-Chromosom lokalisiert, welches in weiblichen Zellen funktionell hemizygot, in männlichen Zellen hemizygot, also nur auf einem Allel, vorhanden ist.
2. HPRT ist ein nicht-essentielles Enzym für Zellen in der Zellkultur, da die Purinnukleotid-Synthese auch *de novo* stattfinden kann.
3. Mutanten können sehr leicht selektiert werden.

Die *hpert*-Gene von Maus, Ratte, Chinesischem Hamster und Mensch sind etwa 34-40 kb groß und enthalten neun Exons. Die Homologie der cDNA von Maus, Hamster und Mensch ist >95% in codierenden und ca. 80% in nicht-transkribierten Regionen. Die HPRT-Proteine der o.g. Spezies bestehen aus 218 Aminosäureresten und unterscheiden sich in max. zehn davon.

Für die Ausbildung einer 6-Thioguanin-Resistenz konnten viele verschiedene Mutationen verantwortlich gemacht werden (Stand: 1993): 727 unabhängige Einzelbasensubstitutionen mit allen 12 möglichen Basenaustauschen (daraus resultierend: 151 Aminosäureaustausche) und 435 nicht auf Einzelbasensubstitutionen beruhende Mutationen wie Tandem-Substitutionen, -1 und +1 Frameshift-Mutationen aller vier Basen und Deletionen weniger Basen oder ganzer Exons. Insertionen sind seltener und beruhen meist auf Duplikationen. Durch Trimethylpsoralen und UVA-Strahlung induzierte

Mutationen waren in humanen Lymphozyten hauptsächlich Basenaustausche (T/A \rightarrow A/T, aber auch G/C, C/G). Von den mind. 190 Thymin-Basen im humanen *hpert*-Gen (codierende Regionen und splicing sites) befinden sich 99 in 5'-TpA- oder 5'-ApT-Regionen, wobei Laquerbe et al. (1995) zeigten, dass 80% aller Basensubstitutionen im 5' \rightarrow 3'-Strang an nur 18 dieser 99 Thymin-Basen stattfinden, was auf eine spezielle Signatur Trimethylpsoralen-induzierter Basenaustausche schließen lässt.

Als Folgen einer HPRT-Defizienz sind eine erhöhte PRPP-Konzentration, ein deutlicher Anstieg der *de novo*-Synthese und eine Überproduktion von Urat, dem Endprodukt des Purinabbaus, zu nennen. Beim Menschen kommt es so zur Ausbildung von Harnsäurekristallen, die sich in den Gelenken ablagern, und somit zur Gicht. Ein weiteres Krankheitsbild ist das Lesch-Nyhan-Syndrom, dessen Charakteristika ein zwanghafter Hang zur Selbstzerstörung, aber auch geistige Behinderung und spastisches Verhalten sind, wobei der Zusammenhang zwischen dem Fehlen der HPRT und den komplexen neurologischen Symptomen noch nicht eindeutig geklärt ist (Laquerbe et al. 1995, Bradley et al. 1981, Glatt 1993, Stout and Caskey 1985, Würzler 1993, Berg and Stryer 2003, Michael 1999, Papadopoulos et al. 1993).

2.6.3 Mikrokerne

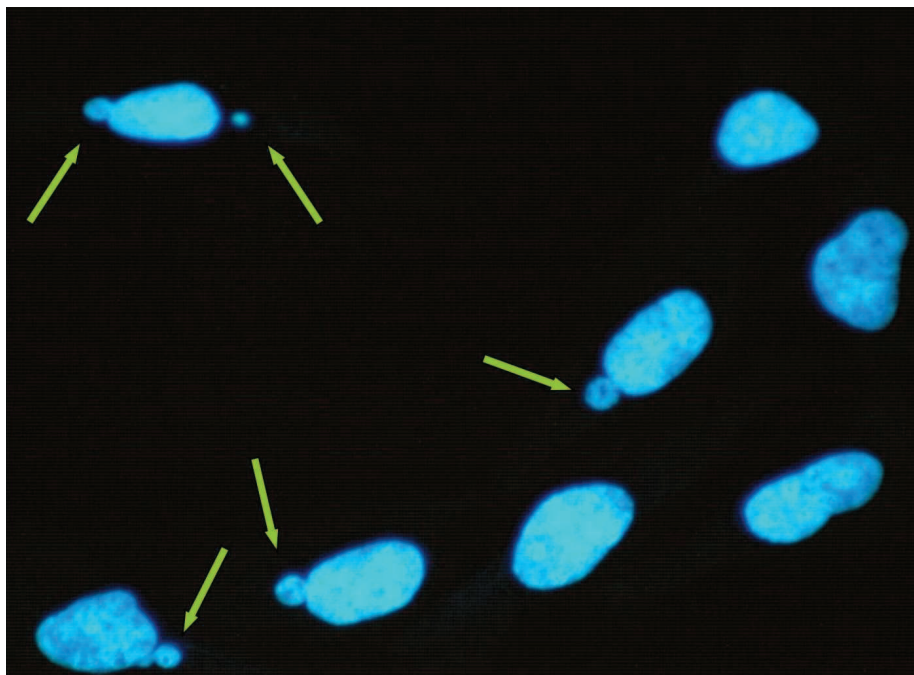


Abb. 2.6.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme DAPI-gefärbter V79-Zellen nach Behandlung mit Mitomycin C (0,2 μ g/ml, 24 h, 20 h Nachinkubation); entstandene Mikrokerne sind mit Pfeilen markiert.

Mikrokerne in eukaryontischen Zellen sind kleine, chromatinhaltige Partikel, die von einer Kernmembran umgeben sind und parallel zum Hauptkern existieren können. Sie entstehen in der Regel aus sich in der Teilung befindenden Zellen, wenn während der Mitose die Kernmembran aufgelöst und an deren Ende um die meist eng beieinander liegenden Chromosomen wiederaufgebaut wird. Hier kann es vorkommen, dass Chromosomenbruchstücke, ganze Chromosomen oder Chromosomengruppen von einer eigenen Kernmembran umgeben werden, wenn sie während der Telophase nicht alle nahe

beieinander liegen, sondern während der Teilung in der Äquatorialebene zurückbleiben. Bei vielen Spezies ist dies während der ersten Furchungsteilungen ein normaler Vorgang, kann aber auch nach Mutagenbelastung in verschiedensten Zellen vonstatten gehen. Zu unterscheiden sind hier aneugen und clastogen wirkende Substanzen. Erstere führen zum Verlust ganzer Chromosomen, letztere zum Verlust von Chromosomenbruchstücken.

2.6.3.1 Entstehung von Mikrokernen

Abb. 2.6.3.1a fasst die Entstehungsmöglichkeiten von Mikrokernen zusammen:

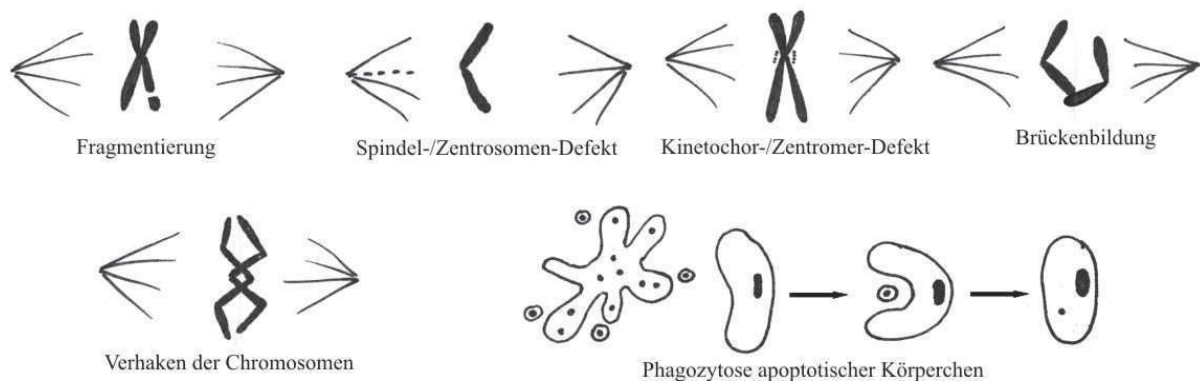


Abb. 2.6.3.1a: Schematische Darstellung der Entstehungsmechanismen von Mikrokernen modifiziert nach (Heddle et al. 1991, Zankl 1999)

1. Mikrokerne durch Fragmentierung:

Das Auftreten von Chromosomen- bzw. Chromatid-Bruchstücken führt zu Entstehung von meist azentrischen Fragmenten. Diese Bruchstücke können bei der Zellteilung, abhängig von der Größe des Bruchstücks und der Zelle, oft nicht in die Kerne der beiden Tochterzellen integriert werden, verdeutlicht von Abb. 2.6.3.1b. Auf die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Clastogene soll unter 2.6.3.2 näher eingegangen werden.

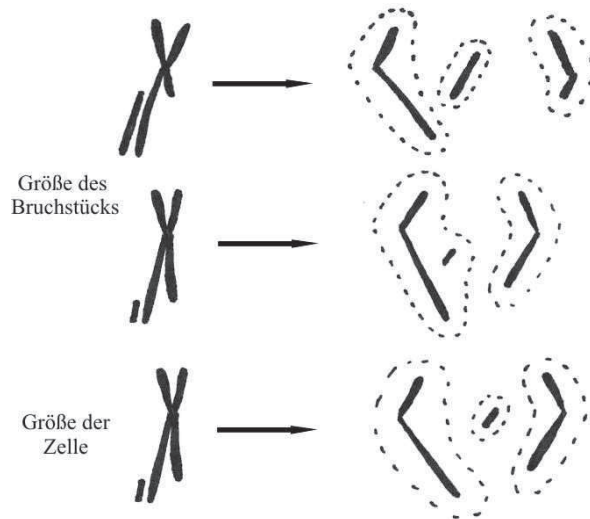


Abb. 2.6.3.1b: Mikrokerne aus azentrischen Fragmenten

2. Mikrokerne durch Spindel- / Zentrosomen-Defekt aufgrund von Aneugen: Der Spindelapparat bietet zwei Hauptangriffspunkte: Mikrotubuli und Zentrosomen. Spindelgifte können die Polymerisation der Tubulin-Dimere zu den Mikrotubuli hemmen oder stabilisieren, so dass diese nicht mehr kontinuierlich auf- und abgebaut werden können, wodurch die Chromatiden nicht mehr zu den Polen der Mitosespindel der Tochterzellen gezogen werden können. Diese Pole, die Zentrosomen, bestehen aus je zwei Zentriolen und vieler damit assoziierter Proteine, wobei γ -Tubulin die Verbindung zwischen Zentrosomen und Mikrotubuli darstellt. Gifte können hier z.B. die Replikation

der Zentrosomen stören. Durch diese Defekte können die Chromatiden nicht zum Pol der Mitosespindel wandern, bleiben zurück und gehen entweder bei der Teilung verloren oder bleiben im Zytoplasma der Tochterzelle liegen, wo sie eine eigene Kernmembran ausbilden und zum Mikrokern werden.

3. Mikrokerne durch Kinetochor- / Zentromer-Defekt aufgrund von Aneugenien: Das Kinetochor ist der Protein-DNA-Komplex am Zentromer des Chromosoms, an den die Mikrotubuli des Spindelapparates binden, um die Chromatiden zu trennen. Mögliche Angriffspunkte sind hier die Kinetochor-Replikation und -Aktivierung. Einige Gifte wie Mitomycin C können die Kinetochore auch ganz vom Chromosom ablösen. Auch hier verbleiben die Chromosomen auf der Äquatorialebene, wo sie entweder verloren gehen oder als Mikrokerne in eine der Tochterzellen integriert werden.

4. Mikrokerne durch Brückenbildung: Chromosomale Brücken zwischen Kernen der Tochterzellen entstehen, wenn sich Chromosomen oder Chromatiden falsch in der Äquatorialebene einordnen. Diese zerreißen meist und die so entstandenen Fragmente können zur Bildung von Mikrokernen führen.

5. Mikrokerne durch Verhaken der Chromosomen: Chromosomen oder Chromatiden können in der Äquatorialebene verhaken und sich so an der Wanderung zu den Spindelpolen hindern. Analog zur Brückenbildung kommt es zur Zerreißung und anschließender Mikrokern-Bildung.

6. Mikrokerne durch Phagozytose apoptotischer Körperchen: Während der Apoptose entstehen sog. apoptotische Bodies, also mit einer Kernmembran umgebene Fragmente. Die werden von anderen Zellen phagozytiert und erscheinen als mikrokernähnliche Gebilde in deren Zellplasma. Diese sind im Gegensatz zu echten Mikrokernen nicht während der Zellteilung entstanden und stehen auch mit mutagenen Effekten nicht im direkten Zusammenhang (Romagna 1993, Zankl 1999, Countryman and Heddle 1976, Fenech 2000, Madle et al. 1993, Heddle et al. 1991, Cassimeris 1999, Dellarco, Mavournin and Tice 1985, Schiebel 2000, Choo 2000).

2.6.3.2 Wirkweisen clastogener Substanzen

Clastogene sind Substanzen, die Chromosomenmutationen, also lichtmikroskopisch erkennbare strukturelle Veränderungen der Chromosomen, durch den Verlust von Chromosomen- oder Chromatid-Bruchstücken verursachen. Voraussetzung dafür ist die Ausbildung eines DNA-Doppelstrangbruchs (DSB), der entweder von der Substanz direkt, aber auch in Kombination mit zellulären Enzymen verursacht wird. Im Folgenden aufgelistet sind mögliche Ursachen für substanzinduzierte primäre Schäden, die zu DSBs führen können:

Doppelstrangbruch-induzierende Substanzen: DSBs entstehen zellzyklusunabhängig durch „physikalische“ Mutagene wie ionisierender Strahlung oder mechanischen Stress, aber auch durch einige Chemotherapeutika oder ROS. Durch den DSB wird ein Chromatid-Stück vom restlichen Chromosom / Chromatid abgetrennt und kann so, da es nicht mehr über das Kinetochor mit der Mitosespindel verbunden ist, während der Mitose zum Zentrosom einer Tochterzelle hingezogen und in deren späteren Zellkern integriert werden. Vielmehr verbleiben diese Bruchstücke in der Äquatorialebene und können zufällig in eine der Tochterzellen als Mikrokern integriert werden.

Einzelstrangbruch-induzierende Substanzen: Trifft die DNA-Polymerase in der S-Phase auf einen Einzelstrangbruch, wird die Synthese an dieser Stelle gestoppt. Kann der Schaden nicht repariert werden, läuft die Replikation auch nicht weiter und ein Doppelstrangbruch entsteht (vgl. oben).

Alkylantien: Alkylierungen der DNA-Basen können in der Schwächung der N-glykosidischen Bindung resultieren, was zur spontanen oder enzymatischen Entfernung durch Reparaturenzyme der beschädigten Base führt. Entweder wird durch die „Base excision repair“ (BER) nur die Base entfernt, was eine apurine oder apyrimidine (AP-) Stelle hinterlässt, oder bei sterisch aufwändigen Alkylierungen („bulky adducts“) durch die „nucleotide excision repair“ (NER) das gesamte Nukleotid. Die Replikation mittels DNA-Polymerase wird gehemmt, wodurch ein Einzelstrangbruch (vgl. oben) entstehen kann.

DNA-quervernetzende Substanzen: Hier müssen zwei Möglichkeiten unterschieden werden. DNA-quervernetzende Substanzen wie Furocumarine werden dabei wie Alkylantien behandelt. DNA-DNA-quervernetzende Substanzen verknüpfen verschiedene DNA-Doppelstränge, wodurch keine geordnete Replikation stattfinden kann und die Chromatiden während der Mitose nicht getrennt werden können, weshalb durch den Zug der Mitosespindel Bruchstücke entstehen können.

ROS-induzierende Substanzen: Durch reaktive Sauerstoffspezies können ein Vielzahl von Schäden induziert werden, wie DNA-Einzelstrangbrüche, AP-Stellen oder verschiedene Basenmodifikationen, die durch Reparaturenzyme ausgeschnitten werden (vgl. 2.4.2.2).

Bei den von Furocumarinen in Kombination mit UVA-Licht induzierten Schäden handelt es sich um DNA-Monoaddukte und Crosslinks, also DNA-Alkylierungen, und verschiedene durch ROS ($^1\text{O}_2$ und $\text{O}_2^{\cdot-}$) induzierte Schäden (Madle et al. 1993, Obe et al. 1992, Schumacher 2005, Youssefi et al. 1994, Khanna and Jackson 2001).

Die Bildung von Mikrokernen durch Aneugene erfolgt nach einem zeitlich einfachen Verlauf, durch Clastogene kann die Mikrokern-Bildung aufgrund der oben beschriebenen verschiedenen Wirkmechanismen zeitlich variabel ablaufen. Abb. 2.6.3.2 gibt einen schematischen Überblick ohne Berücksichtigung möglicher Reparaturmechanismen über die meist S-Phase-abhängigen Aberrationen.

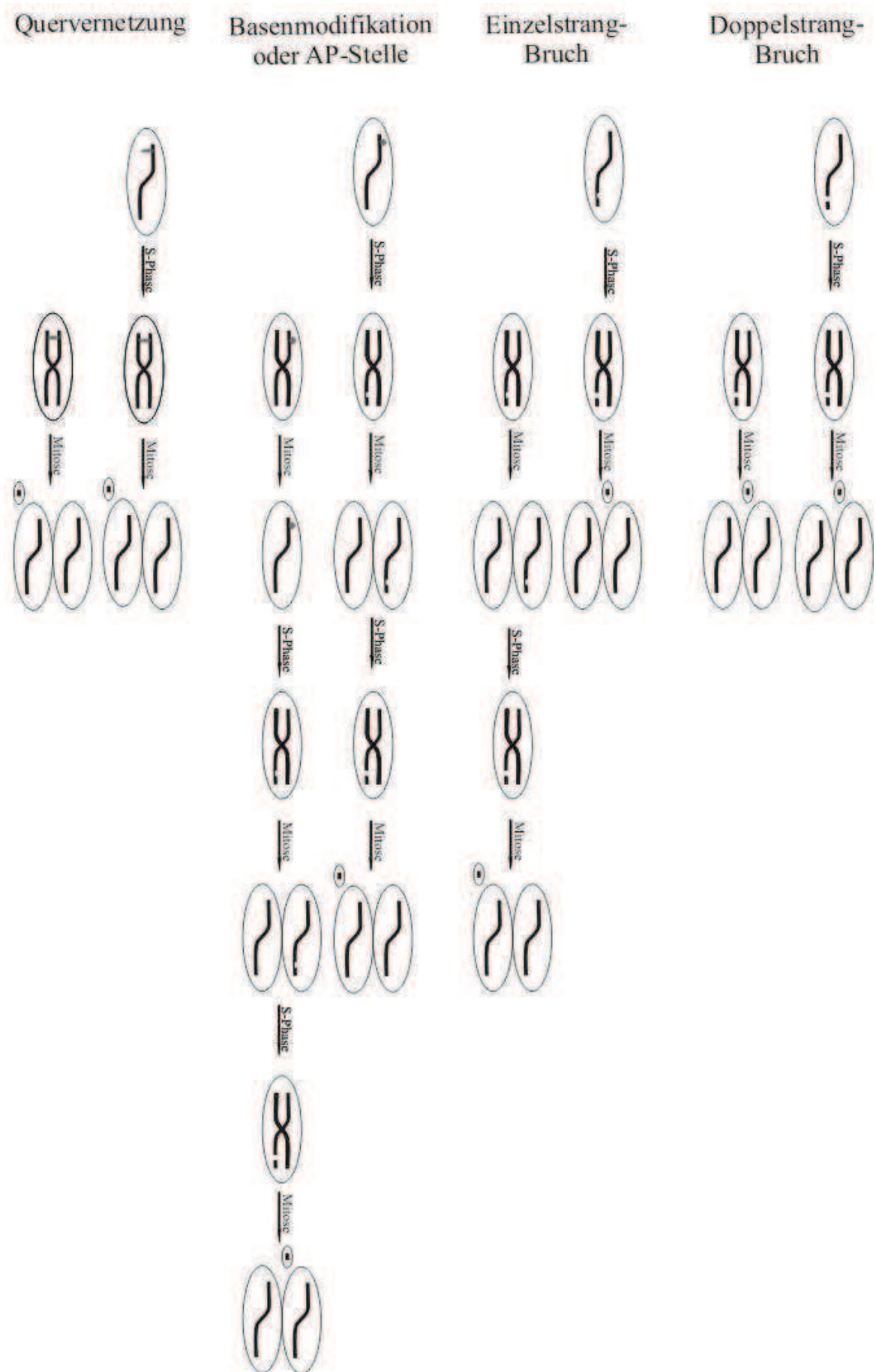


Abb. 2.6.3.2: Mikrokernentstehung während des Zellzyklus durch verschiedene clastogene Mechanismen

2.6.3.3 Mikrokern-Testsysteme (MNAs)

Es existiert eine Vielzahl verschiedener Mikrokern-Testsysteme. Zum einen *in vivo*, um z.B. kinetische Einflüsse auf die Testsubstanz mit einschließen zu können, wie der Standard-MNA mit Nager-Erythrozyten (OECD 474), aber auch Tests mit peripherem Blut, epithelialen Zellen oder Pflanzen. In neuerer Zeit wurden auch *in vitro* Testsysteme an Lymphozyten oder permanenten Zelllinien etabliert und seit Juli 2010 auch in einer OECD-Guideline (487) festgehalten, da zuverlässige und empfindliche Systeme existieren, mit denen Versuchstiere und Kosten eingespart werden können. Ein MNA kann auf verschiedene Zellen und Endpunkte optimiert werden:

Doppelkern- / Zytokinese-Block (CB)-Methode: Mikrokernne können nur in Zellen entstehen, die eine Kernteilung durchlaufen haben. Durch die Zugabe von Cytochalasin B (CB), einem Zytokinese-Blocker, der zwar die Ausbildung zweier Tochterkerne, nicht aber die Trennung des Zytoplasmas erlaubt, können Zellen, die schon eine Mitose durchlaufen haben, eindeutig an Hand der zwei nahezu symmetrischen Tochterkernen im gleichen Zytoplasma identifiziert werden. Sinnvoll ist der Einsatz von CB daher bei Zelllinien, deren Proliferationsgeschwindigkeit Schwankungen unterliegt, oder bei Lymphozyten, deren Wachstums-Stimulierbarkeit interindividuellen Schwankungen unterliegt. So können Schwankungen und falsch-negative Ergebnisse minimiert werden. Bei Zelllinien mit kurzer und reproduzierbarer Verdopplungszeit, wie V79-Zellen, ist der Einsatz von Cytochalasin B nicht nötig; hier liefern die Methoden mit und ohne CB vergleichbare Ergebnisse. Weitere Vorteile der CB-Methode sind die Bestimmung der Mitoserate, eine erhöhte Sensitivität, da das Auftreten von Mikrokernen in zweikernigen Zellen doppelt so hoch ist wie die in zwei Tochterzellen nach Abschluss der Zytokinese, die mögliche Detektion nuklearer Brückenbildung oder die Detektion ansonsten reparierter DNA-Schäden durch Zugabe von Reparaturenzymhemmern wie Cytosin-Arabinosid.

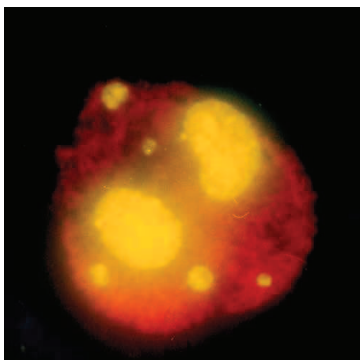


Abb. 2.6.3.3a: Doppelkernige Zelle

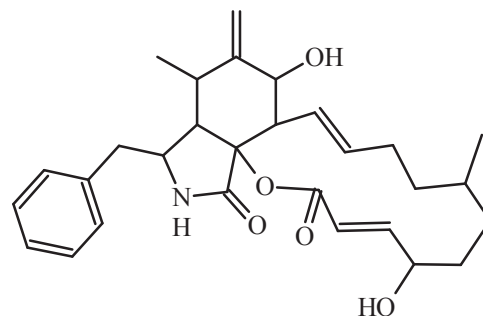


Abb. 2.6.3.3b: Cytochalasin B

Unterscheidung zwischen Aneugenen und Clastogenen: Erste einfache Unterscheidungsmöglichkeiten waren das Messen des Mikrokerndurchmessers (Yamamoto 1980) oder der Mikrokerngröße, DNA-Gehalt und Gehalt an C-Band-positivem Material (Vanderkerken 1989). Diese waren wenig zuverlässig, da auch in Mikrokernen DNA-Synthese stattfinden kann und z.B. das Y-Chromosom in Mäusen kein C-Heterochromatin besitzt.

Mit der von Vig und Swearngin (1986) entwickelten CREST-Methode (CREST: Calcinosis cutis, Raynauds-Phänomen, esophagealer Dysfunktion, Sklerodaktylie, Teleangiectasien) werden Kinetochorproteine immunologisch Fluoreszenz-markiert. Als Primärantikörper dienen Anti-Kinetochor-Antikörper aus dem Serum von Personen mit

bestimmten Formen von Scleroderma pigmentosum, die an die Kinetochore aller Säugerzellen binden können. Diese werden dann durch fluoreszenzmarkierte Sekundär-Antikörper sichtbar gemacht. Vereinfacht wird nun angenommen, dass bei der Detektion des Kinetochors ein ganzes Chromosom vorliegt, während Kinetochor-negative Mikrokerne aus einem Chromosomen-Bruchstück bestehen. Mögliche Fehlerquellen sind substanzinduzierte Ablösungen des Kinetochorproteins vom Chromosom, z.B. durch Mitomycin C, weswegen auch Mikrokerne, die aus ganzen Chromosomen bestehen, Kinetochor-negativ sein können.

Eastmond und Pinkel (1990) entwickelten die FISH-Methode (FISH: Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung). Dabei werden Fluoreszenz-markierte DNA Sonden eingesetzt, die sich an den kovalenten DNA-Strang anlagern, z.B. in der Zentromer- und/oder Telomer-Region. Bei kombiniertem Einsatz dieser Sonden kann sichergestellt werden, dass ein vollständiges Chromosom detektiert wird.

Unterscheidung zwischen Chromosomen-Verlust und -Fehlverteilungen: Mit Hilfe der o.g. FISH-Methode kann zwischen dem Verlust eines Chromosoms als Mikrokern und als Nondisjunktion (Fehlverteilung) unterschieden werden. Dabei werden Chromosomen-spezifische DNA-Sonden eingesetzt. Während diploide Zellkerne zwei Kopien eines Chromosoms enthalten und somit zwei Fluoreszenzsignale aussenden, gehen von hypodiploiden Tochterkernen nur 0 oder 1 Signal aus, von hyperdiploiden 3 oder 4. Kombiniert wird FISH idealerweise mit der CB-Methode, um nur Zellen mit der korrekten Anzahl an Signalen auszuwerten.

Apoptose: Apoptose ist der nicht-inflammatorische, genetisch kontrollierte und programmierte Zelltod, der als natürlicher Prozess während der pränatalen Entwicklung, aber u.a. auch als Antwort auf DNA-Schäden, abläuft. Dieser geht mit morphologischen Veränderungen einher und kann parallel zur Mikrokerninduktion lichtmikroskopisch bestimmt werden. Charakteristisch sind Chromatin-Kondensation um die Peripherie des Zellkerns, verringertes Zellvolumen, Kondensation des Zytoplasmas und Abtrennung von Zytoplasma und Kern in membrangebundene Vesikel (blebs, „Bläschen“). Generell sollten apoptotische Zellen bei der Bestimmung der Mikrokernrate ignoriert werden.

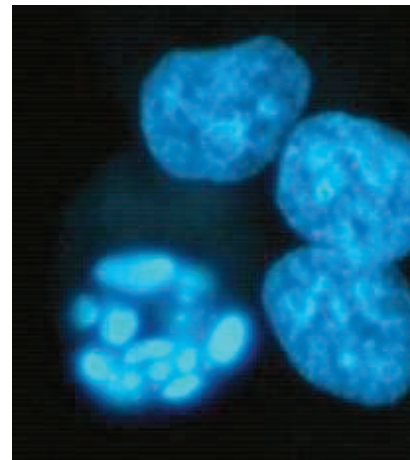


Abb. 2.6.3.3c: Apoptotische Zelle, DAPI-Färbung

Zur Vereinheitlichung des MNA sind die von Countryman (1976) genannten Kriterien für Mikrokerne und deren Analyse in Stellungnahmen bis heute im Prinzip nicht verändert:

- Der Durchmesser soll 1/16 bis 1/3 des Hauptkerns betragen.
- Der MN darf nicht lichtbrechend sein.
- Der MN soll die gleiche oder hellere Farbintensität wie der Hauptkern haben.
- Der MN darf nicht mit dem Hauptkern verbunden sein.
- MN und Hauptkern dürfen sich berühren, aber nicht überlappen, nicht weiter als das Drei- oder Vierfache des Hauptkerndurchmessers voneinander getrennt sein und klar voneinander unterscheidbar sein.
- Nicht gezählt werden sollen Zellkernausstülpungen, apoptotische Körperchen, Zellen mit mehreren Kernen (Ausnahme: 2 Kerne bei CB-Methode) und Zellen mit mehr als drei

Mikrokernen (von der Hude et al. 2000, Fenech 2000, Countryman and Heddle 1976, Kalweit et al. 1999, OECD 1997, OECD 2010, Fenech 1997, Eastmond and Pinkel 1990, Vanderkerken et al. 1989, Vig and Swearngin 1986, Yamamoto and Kikuchi 1980, Wyllie 1992, Dellarco et al. 1985, Marzin 1997).

3 Zielstellung

Furocumarine (FC) werden von verschiedenen Pflanzen als Phytoalexine gebildet und kommen auch in einigen Obst- und Gemüsesorten wie Zitrusfrüchten, Sellerie oder deren Zubereitungen vor. Der Mensch ist durchschnittlich Gesamt-FC-Mengen von etwa 0,56 mg pro Tag exponiert (SKLM 2010), beim Verzehr von z.B. mikrobiell infiziertem Sellerie kann es jedoch durchaus zu Akutexpositionen von 45 mg kommen (Ljunggren 1990). In der Regel wird von einer Pflanze nicht nur ein einziges Furocumarinderivat synthetisiert, normalerweise sind mitunter komplexe Furocumarinemische die Regel. Über 90 natürlich vorkommende Derivate sind bisher bekannt (Scott, Pathak and Mohn 1976).

In Kombination mit UVA-Strahlung besitzen sie phototoxische, photomutagene und photoclastogene Eigenschaften, die hauptsächlich auf die UVA-induzierte, kovalente Bindung an die DNA zurückzuführen sind (Kersten et al. 1999, Papadopoulo and Auerbeck 1985, Kitamura, Kohtani and Nakagaki 2005). *In vivo* können sie Erytheme oder sogar Hautkrebs verursachen (IARC 1986, Musajo and Rodighiero 1972).

Bezüglich ihrer Photoreaktivität weisen die verschiedenen Furocumarinderivate untereinander erhebliche Varianzen auf, die auf Unterschiede in der chemischen Struktur des Grundgerüsts oder der Art und Position der Substituenten zurückzuführen sind. Diese Varianzen werden z.B. bei der Bewertung von FC-haltigen Lebensmitteln nicht berücksichtigt; vielmehr ist die Angabe der Gesamt-FC-Menge üblich, die analog zu einem FC mit bekannter Phototoxizität wie 8-MOP in einem Worst-Case-Szenario bewertet wird (SKLM 2006). Der Mangel an Informationen über das genaue phototoxische Potential der einzelnen Derivate ist vermutlich die Ursache einer derartigen Bewertung. Auch sind mögliche Wechselwirkungen der Furocumarine untereinander kaum charakterisiert, beziehen sich nur auf binäre Mischungen (Schlatte et al. 1991) oder sind widersprüchlich (Calcagno et al. 2002, Diawara et al. 1993).

Daher ist das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit die Etablierung eines *in vitro* Phototoxizitäts- und Photogentoxizitäts-Systems zur Charakterisierung der phototoxischen Potenz einer Vielzahl natürlich vorkommender Furocumarinderivate in Relation zu dem potentesten Vertreter. So soll im Idealfall jedem Furocumarin für jeden Test ein Äquivalenzfaktor zugeordnet werden können, wodurch ein einfaches Instrument zur Bewertung komplexer Furocumarinemische entwickelt werden kann.

An dieses Testsystem werden verschiedene Anforderungen gestellt:

- Die Unterschiede zum Menschen sollen möglichst gering sein, weshalb Säugerzellen Bakterien vorzuziehen sind (Müller and Kasper 1998).
- Es soll geeignet sein, die Endpunkte Zellvitalität, Gen-, Chromosomen- und Genom-Mutationen zu quantifizieren, da so die Phototoxizität, aber auch Kanzerogenität *in vivo* recht gut abgeschätzt werden können (ECHA 2008, Reichl and Schwenk 2004, Frötschl 2007).
- Da es sich um eine große Anzahl von Einzelsubstanzen handelt, sollte die Versuchsdurchführung möglichst zeit- und kosteneffizient sein.

Für die *in-vitro*-Untersuchungen bieten sich V79-Zellen an, bei denen es sich um Lungenfibroblasten eines männlichen Chinesischen Hamsters handelt. Sie zeichnen sich u.a. durch eine rasche Verdopplungszeit und reproduzierbare Charakteristik aus. Weiterhin

exprimieren sie keine Cytochrome P450-abhängige Monooxygenasen, was vorteilhaft ist, da Furocumarine unmetabolisiert photochemisch aktiv sind. Aufgrund nur eines vorhandenen Allels des *hprt*-Gens können in diesem Locus Mutationen sehr leicht detektiert werden (Glatt 1993, Krahn 1983, Ford and Yerganian 1958, Bradley et al. 1981), weshalb der HPRT-Assay zur Quantifizierung von Genmutationen verwendet wird. Zur Bestimmung von Chromosomen- und Genom-Mutationen wird der Mikrokerntest verwendet. Die geeignetste Methode zur Zytotoxizitätsbestimmung soll über den Vergleich von Resazurin-Reduktionstest, Neutralrot-Aufnahmetest und Bicinchoninsäure-Assay bestimmt werden und hinsichtlich der benötigten Nachinkubationszeit nach der Bestrahlung durch detaillierte Charakterisierung der phototoxischen Effekte optimiert werden. Alle zellbasierten Assays müssen zudem in ihrer Durchführung für die Detektion photochemisch induzierter Effekte gegenüber klassischen Anwendungen modifiziert werden.

Ist das Testsystem etabliert, soll zunächst der Zusammenhang zwischen applizierter UVA-Dosis und Furocumarin-Konzentration exemplarisch an 5-MOP und Angelicin untersucht werden. Darüber soll eine geeignete, fixe Strahlungsdosis ermittelt werden, mit Hilfe derer das phototoxische, photomutagene und photoclastogene Potential aller zu testenden Furocumarine standardisiert bestimmt und verglichen werden kann, um jedem Furocumarin testspezifische Äquivalenzfaktoren zuordnen zu können.

Da die Etablierung eines Äquivalenzfaktoren-Konzepts nur bei Vorliegen gleichwertiger toxikologischer Endpunkte, Dosis-Additivität und / oder paralleler Dosis-Wirkungs-Beziehungen (DRC) möglich ist (Reffstrup, Larsen and Meyer 2010, Safe 1998, US-EPA 2000), soll weiterhin untersucht werden, welche Art der Additivität bei Furocumarinmischungen vorliegt oder mögliche Wechselwirkungen charakterisiert werden. Dazu soll exemplarisch an 5-MOP und 8-MOP eine isobolographische Analyse durchgeführt werden, für verschiedene Furocumarinmischungen der Interaktions-Index CI bestimmt werden und die DRCs von 5-MOP mit hypothetischen, berechneten Konzentrationen von 5-MOP-Dosis-Äquivalenten verglichen werden.

Abschließend soll auf einige mögliche Ursachen für die Reaktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Furocumarinen eingegangen werden. Zu diesem Zweck werden deren Absorptionsspektren verglichen, um mögliche Unterschiede in der Absorption der applizierten UVA-Strahlung zu untersuchen. Weiterhin sollen durch Bestimmung hypochromer und bathochromer Effekte in Lösungen von Kalbsthymus-DNA die Interkalationsfähigkeit der FCs überprüft und mittels Ethidiumbromid- und Hoechst33258-Verdrängungsassay weitere Interaktionen mit der DNA überprüft werden. Zudem soll zellfrei die Fähigkeit der FC quantifiziert werden, Singulett-Sauerstoff und Superoxidradikal-Anionen photochemisch zu bilden, da reaktive Sauerstoff-Spezies ebenfalls zur Induktion toxischer und gentoxischer Effekte fähig sind (Klotz, Kroncke and Sies 2003).

4 Materialien

4.1 V79-Zelllinie

Die in dieser Arbeit verwendeten V79-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. G. Eisenbrand zur Verfügung gestellt und ursprünglich von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Deutschland, erworben.

4.2 UV-Bestrahlungskammer

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Bestrahlungen mit UVA-Licht wurden in einer UV-Bestrahlungskammer BS-03 (Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Ettlingen, Deutschland), ausgestattet mit UVA- und UVB-Leuchtstoffröhren und einem UV-MAT-Dosimeter, vorgenommen. Die Leuchtstoffröhren lassen sich getrennt ansteuern, so dass gezielt mit UVA-Licht gearbeitet werden konnte. Abbildung 4.2 zeigt das Emissionsspektrum der UVA-Leuchtstoffröhren; gut zu erkennen sind die Maxima eines breiteren Peaks bei 371 nm und eines scharfen Peaks bei 365 nm, also dem optimalen Wellenlängenbereich für Untersuchungen zur Furocumarin-Photochemie (Lai et al., 2008; Rocha et al., 2004; Saffran et al., 1982). Dennoch sind in diesem Spektrum geringe UVB-Anteile (< 320 nm) enthalten; das Verhältnis UVA:UVB wurde mit Hilfe der während des HPRT-Assays gemessenen Strahlungsdosen als 112,5:1 bestimmt.

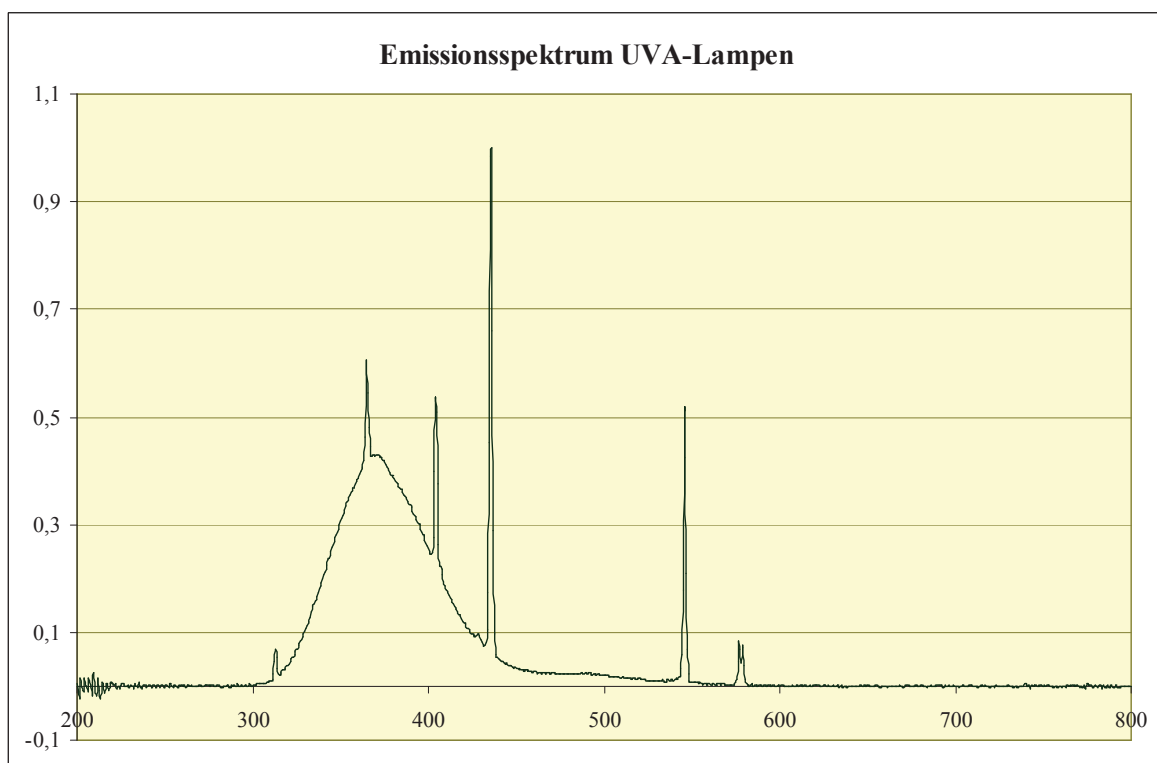


Abb. 4.2: Emissionsspektrum der UVA-Leuchtstoffröhren der Bestrahlungskammer

4.3 Chemikalien

Tab. 4.3: Alphabetische Auflistung der verwendeten Chemikalien/Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Actinomycin D	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
Angelicin	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D; Herboreal Ltd., Edinburgh, UK
BCA Protein Assay Kit (Pierce®)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, D
Bergamottin	Roth, Karlsruhe, D
Bergaptol	Herboreal Ltd., Edinburgh, UK
BSA (bovines Serum-Albumin)	Roth, Karlsruhe, D
Byakangelicin	Herboreal Ltd., Edinburgh, UK
Cumarin	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Applichem, Darmstadt, D
N,N-Dimethyl-p-nitrosoanilin	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
Desoxyribonukleinsäure (DNA, calf thymus, highly polymerized)	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
6',7'-Dihydroxybergamottin	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D; Herboreal Ltd., Edinburgh, UK
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
DMEM low glucose (1g/l) m. L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Eisessig (Essigsäure 37%)	Merck, Darmstadt, D
Epoxybergamottin	PhytoLab GmbH & Co KG, Vestenbergsgreuth, D
Ethanol, p.a.	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol, techn.	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid-Lsg. 1% (10 mg/ml)	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Heraclenin	PhytoLab GmbH & Co KG, Vestenbergsgreuth, D
Histidin	Roth, Karlsruhe, D
Hoechst 33258 (Bis-Benzimid), Trihydrochlorid	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
Immersionsöl	Merck, Darmstadt, D
Imperatorin	Roth, Karlsruhe, D
Isobergapten	Herboreal Ltd., Edinburgh, UK
Isoimperatorin	PhytoLab GmbH & Co KG, Vestenbergsgreuth, D
Isopimpinellin	Roth, Karlsruhe, D
Kaiser's Glyceringelatine	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, D
Khellin	Roth, Karlsruhe, D
Limettin	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Methanol, techn.	Merck, Karlsruhe, D
Methylenblau	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG; moistened with ca. 50% water))	TCI Europe, Zwijndrecht, B
5-Methoxypsoralen (5-MOP)	TCI Europe, Zwijndrecht, B; Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
8-Methoxypsoralen (8-MOP)	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
Mitomycin C	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Karlsruhe, D
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Karlsruhe, D
Natriumpyruvatlsg. (100 mM)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Netropsin	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
Neutralrot	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
Oxypeucedanin	PhytoLab GmbH & Co KG, Vestenbergsgreuth, D
Oxypeucedaninhydrat	Herboreal Ltd., Edinburgh, UK
Penicillin/Streptomycin (P/S, 100x Konzentrat)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Phellopterin	Herboreal Ltd., Edinburgh, UK
Pimpinellin	Herboreal Ltd., Edinburgh, UK
Psoralen	Roth, Karlsruhe, D
Resazurin (Na-Salz)	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
Saponin	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
Sphondin	Herboreal Ltd., Edinburgh, UK
6-Thioguanin (2-Amino-6-mercaptopurin)	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
Triton X-100	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
Trypanblau-Lsg. (0,4%)	Sigma-Adrich, Schnelldorf, D
Trypsin/EDTA(1:250)-Lsg.	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Xanthotoxol	Herboreal Ltd., Edinburgh, UK

4.4 Verbrauchsmaterial

Tab. 4.4: Alphabetische Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Combitips (5 ml, 10 ml, 25 ml, Eppendorf Biopur)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Deckgläser (24x32mm)	Roth, Karlsruhe, D
Mikro-Reaktionsgefäße (1,5ml & 2ml, PP)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Mikrotiterplatten (24 & 96 well, PP)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Mikrotiterplatten (96 well, UV-Plate, Fluorocarbon-Folienboden)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe, D
Petrischalen, 94mm & 60mm	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D; PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Pipettenspitzen, div. Größen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Probenröhrchen (Falcon, 4ml, 14ml, 15ml, 50ml, PP)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
PTFE Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm)	Roth, Karlsruhe, D
Sterican Einmal-Kanüle stumpf	B Braun, Melsungen, D
Zellkulturflasche (250ml, PP)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D; PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D

4.5 Geräte

Tab. 4.5: Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav Varioklav Typ 500	H&P Labortechnik, München, D
Autoklav UNOLD, Electro	UNOLD, Hockenheim, D
Biofreezer MDF-U6086S	Sanyo E&E Europe BV, AZ Etten Leur, NL
Brutschrank BBD6220 Heraeus	Heraeus, Hanau, D
Brutschrank Cytoperm	Heraeus, Hanau, D
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena, D
Glasgeräte (Bechergläser, Messpipetten & -Zylinder, Schraubflaschen)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Handstückzähler	Roth, Karlsruhe, D
Handstückzähler, zuverlässig, Modell „Zähli“	Werbegeschenk Roche Applied Science, USA
Kamera moticam 1000	Motic China Group, Ltd., Xiamen, CN
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Elektro, Kelheim, D
Membran-Vakuumpumpe vacuubrand	Vacuubrand GmbH & Co KG, Wertheim, D
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena, D
Mikroskop Axioskop	Zeiss, Jena, D
Mikroskop Zeiss IM	Zeiss, Jena, D
Mikroskop Leica DM IRB	Leica, Bonn, D
Multipette® plus (Eppendorf research)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Neubauer improved)	Roth, Karlsruhe, D
pH-Meter	Eutech Instruments Europe B.V. AG Nijkerk, NL
Pipetten eppendorf Research	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Pipetten Pipetman Gilson	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Pipettierhilfe Pipetus accu-jet pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, D
Plattenreader Fluoroskan Ascent FL	Labsystems, Dreieich, D
Plattenreader MWGt Sirius HT Injector	BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
Quitscheentchen “B-Hörnchen”, Modell Motivator	Spaß&Chaoten GmbH&CoKG, LiLaLauneLand, D
Schüttler PMS-1000	Grant-bio Ltd., England, UK
Sterilbank BSB 4A	Gelaire Flow Laboraties, Meckenheim, D

Geräte	Hersteller
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Hanau, D
UVC-Bestrahlungskammer FLX-20M	Biometra Biomedizinische Analytik GmbH,
Vilber Lourmat	Göttingen, D
Vortex Relax 2000	Heidolph, Frankfurt/Main, D
Waage Sartorius BP 210 S	Sartorius AG, Göttingen, D
Waage Sartorius CP64-OCE	Sartorius AG, Göttingen, D
Waage OHAUS Precision Standard	OHAUS, USA
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel, D
Wasserbad Julabo 13	Julabo, Seelbach, D
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, D

4.6 Software

Tab. 4.6: Alphabetische Auflistung der verwendeten Software

Software	Hersteller
ACD/ChemSketch	Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, CA
Ascent Software for Fluoroskan 2.6 FL	Thermo Labsystems , Waltham, USA
Endnote 8.0.2	Thomson ResearchSoft, Carlsbad, CA, USA
Gen5 TM	BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
InStat 3	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Motic Images Plus 2.0 ML	Motic China Group, Ltd., Xiamen, CN
Microsoft Office 2003 (Excel, Word CorelDRAW X3)	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Origin 7.5	Microcal, Northhampton, MA, USA
OSIRIS Property Explorer	Actelion Pharmaceuticals Ltd., Allschwil, SW
PubMed	US National Library of Medicine and the National Institutes of Health, Bethesda, USA

5 Methoden

Generell werden alle Arbeiten, bei denen Furocumarine und Cumarine involviert sind, ohne Kunstlicht in abgedunkelten Räumen durchgeführt, alle (Furo-)cumarin-haltigen Lösungen und Medien werden in abgedunkelten Gefäßen (Braunglas / Aluminiumfolie) aufbewahrt.

5.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten werden steril durchgeführt, alle verwendeten Medien und Lösungen, die mit Zellen in Kontakt kommen, werden im Wasserbad auf 37°C vortemperiert. Generell werden V79-Zellen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert.

5.1.1 Kultivierung und Passagieren der V79-Zelllinie

Die adhärent wachsende V79-Zelllinie wird unter o.g. Standardbedingungen auf 75cm²-Zellkulturflaschen mit mindestens 15 ml DMEM (Dulbecco's modified Eagles Medium), versetzt mit FKS (Fötale Kälberserum) und Penicillin/Streptomycin, im Folgenden als N-Medium bezeichnet (Tab. 5.1.1), kultiviert. Um eine kontinuierliche Nährstoffversorgung aufrecht zu erhalten, wird das verbrauchte Nährmedium alle 2-3 Tage mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und durch neues ersetzt. Haben die Zellen Konfluenz erreicht, d.h. einen vollständigen Monolayer ohne freies Substrat zur weiteren Proliferation gebildet, kommt es durch die sog. Kontaktinhibition zum Wachstumsstopp und schlimmstenfalls zum Absterben der Kultur, weswegen der Zellrasen durch Passagieren bei Erreichen der Konfluenz immer wieder ausgedünnt werden muss (Lindl and Bauer 2002, Elkind and Sutton 1959).

Tab. 5.1.1: Für die Zellkultur allgemein benötigte Lösungen

Lösung	Inhalt	Zusammensetzung
N-Medium	DMEM low glucose FKS Penicillin/Streptomycin Lagerung: 4°C, 4 Wochen	89% (500 ml) 10% (56 ml) 1% (5,6 ml)
PBS ⁺⁺	KCl KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄ H ₂ O _{bidest} Lagerung: RT	0,201 g (2,7 mM) 0,204 g (1,5 mM) 8,006 g (137 mM) 0,923 g (6,5 mM) ad 1 l pH = 7,4 einstellen

Zum Passagieren wird das Medium zunächst abgesaugt, der Zellrasen mit 5 ml PBS⁻ (Ca²⁺- und Mg⁺-frei, Tab. 5.1.1) gespült, die Zellen gleichmäßig mit 1 ml 1xTrypsin/EDTA versetzt und für 5-10 min in den Brutschrank gebracht. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von ca. 8 ml serumhaltigem Nährmedium (N-Medium) gestoppt, wenn sich die Zellen sichtbar vom Flaschenboden lösen. Anschließend werden die Zellen mit einer Glaspipette vollständig vom Boden gelöst und durch vorsichtiges Aufsuspendieren vereinzelt. Je nach Verwendungszweck werden die Zellen verdünnt wieder in eine Zellkulturflasche mit 15 ml N-Medium ausgesät oder eine genau definierte Zellmenge nach der Zellzahlbestimmung (5.1.2) auf entsprechende Platten und Schalen aufgebracht.

5.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Um immer die gleiche Anzahl der ausgesäten Zellen und somit die Reproduzierbarkeit der Zellkulturexperimente und ein ungehindertes Zellwachstum bis zum Versuchsende zu gewährleisten, ist die Kenntnis der genauen Zellzahl in der Zellsuspension vonnöten. Hierzu wird eine Neubauer-Zählkammer (Abb. 5.1.1) verwendet, auf die 4x4 Großquadrate, unterteilt in 4x4 Kleinquadrate, eingraviert sind, und auf ein plangeschliffenes Deckglas aufgebracht wird. So entsteht über jedem Quadrat ein Volumen von 0,1 µl. Es werden 20 µl der nach dem Passagieren erhaltenen Zellsuspension mit 20 µl Trypan-Blau-Lösung vermischt und in die Zählkammer pipettiert. Trypan-Blau dringt durch eine nicht intakte Zellmembran in die Zelle ein, wodurch lebende von toten Zellen unterschieden werden können und somit letztere nicht das Ergebnis verfälschen. Unter dem Mikroskop werden nun die Zellen in jedem Großquadrat gezählt und die Zellzahl in Zellen/ml nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl}[\text{Zellen} / \text{ml}] = \sum \left(\frac{Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4}{4} \right) \times VF \times KF$$

Mit: Q_{1-4} = Zellzahl Einzelquadrat
 VF = Verdünnungsfaktor; hier: 2, da 1:1 verdünnt
 KF = Kammerfaktor, hier: 10^4 , da
 $\text{Volumen}_{\text{Quadrat}} : \text{Volumen}_{\text{zu best.}} = 1:10^4$

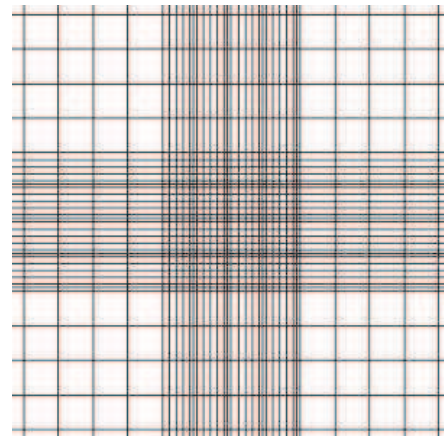


Abb. 5.1.1: Neubauer-Zählkammer

5.1.3 Einfrieren von Zellen

Zur permanenten Lagerung werden Zellen unterschiedlicher Passagen in Form von „stocks“ bei -196°C in flüssigem Stickstoff konserviert; hier finden keinerlei biochemische Reaktionen statt und die Zellen werden so u.a. vor Variabilitäten durch Subkultivierung und Kontaminationen geschützt. Hierzu wird der konfluente Monolayer einer 75cm²-Zellkulturflasche wie oben beschrieben abtrypsiniert, die Zellsuspension in ein 15ml-Probenröhrchen (Falcon) überführt und bei 150 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird

abgesaugt, das Zellpellet wird in 1,2 ml Einfriermedium (Tab. 5.1.3) aufgenommen und in ein Cryogefäß überführt. Dieses wird sofort auf Eis heruntergekühlt, zügig zum weiteren Abkühlen bei -80°C in den Biofreezer gebracht und dann langfristig in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Tab. 5.1.3: Zum Einfrieren von Zellen zusätzlich benötigtes Medium

Medium	Inhalt	Zusammensetzung
Einfriermedium	DMEM low glucose	70% (7 ml)
	FKS	20% (2 ml)
	DMSO	10% (1 ml)
	Lagerung: 4°C, 4 Wochen	

Generell muss hier, wie beim Auftauen auch, schnell vorgegangen werden, da das DMSO im Einfriermedium zytotoxisch wirkt. Bei tiefen Temperaturen schützt es jedoch die Zellen, indem es die Kristallbildung inner- und außerhalb der Zelle sowie die partielle Dehydration des Zellplasmas verhindert (Pegg 2007).

5.1.4 Auftauen von Zellen

Das Cryoröhrchen wird aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, zügig auf Eis zum Wasserbad gebracht, auf 37°C erwärmt und die Zellsuspension in ein 15ml-Falcon überführt, in dem 9 ml N-Medium vorgelegt sind. Dieses wird bei 150 g 5 min zentrifugiert, der Mediumüberstand abgesaugt und das Pellet in 6 ml N-Medium aufgenommen. Je nach gewünschter Aussaatdichte kann diese Zellsuspension auf bis zu vier Zellkulturflaschen, in denen je 15 ml N-Medium vorgelegt sind, aufgeteilt werden und wie unter 5.1.1 beschrieben weiterkultiviert werden, wobei der erste Mediumwechsel nach 24 h erfolgen sollte.

5.2 Methoden zur Erfassung photochemisch induzierter Toxizität

In Tabelle 5.2 sind zunächst die für alle Testsysteme zur Erfassung photochemisch induzierter Toxizität benötigten Lösungen aufgeführt:

Tab. 5.2: Für Toxizitätstests allgemein benötigte Lösungen

Lösung	Inhalt	Zusammensetzung
N-Medium	DMEM low glucose	89% (500 ml)
	FKS	10% (56 ml)
	Penicillin/Streptomycin	1% (5,6 ml)
	Lagerung: 4°C, 4 Wochen	
S-Medium	DMEM low glucose	99% (500 ml)
	Penicillin/Streptomycin	1% (5 ml)
	Lagerung: 4°C, 4 Wochen	

Lösung	Inhalt	Zusammensetzung
PBS ⁻	KCl KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄ H ₂ O _{bidest} Lagerung: RT	0,201 g (2,7 mM) 0,204 g (1,5 mM) 8,006 g (137 mM) 0,923 g (6,5 mM) ad 1 l pH = 7,4 einstellen
(Furo-)cumarin-Lösungen	(Furo-)cumarin im DMSO; versch. Konzentrationen; max. DMSO-Endkonzentration im Medium: 0,5% Lagerung: substanzabhängig, 4°C oder -20°C	
Saponin-Lösung	Saponin in H ₂ O _{bidest}	10%

5.2.1 Resazurin-Reduktionstest

Der Resazurin-Reduktionstest (modifizierter Alamar BlueTM-Assay) dient u.a. zur Messung zytotoxischer Effekte und der Zellproliferation. Dabei wird das oxidierte, blaue Resazurin mit geringer intrinsischer Fluoreszenz durch noch nicht näher bestimmte Oxidoreduktasen lebender / proliferierender Zellen, z.B. unter NADH-Verbrauch, zum reduzierten, pinkfarbenen, stark fluoreszierenden Resorufin umgewandelt (Abb. 5.2.1). Auch wenn weithin postuliert wird, dass für diese Reduktion mitochondriale Enzyme verantwortlich sind, ist nicht vollständig geklärt, ob diese Reaktion intrazellulär, an der Plasmamembranoberfläche oder chemisch im Medium stattfindet; gesichert ist jedoch, dass hierfür der Kontakt mit Zellen notwendig ist und Resazurin höchstwahrscheinlich aufgenommen werden muss.

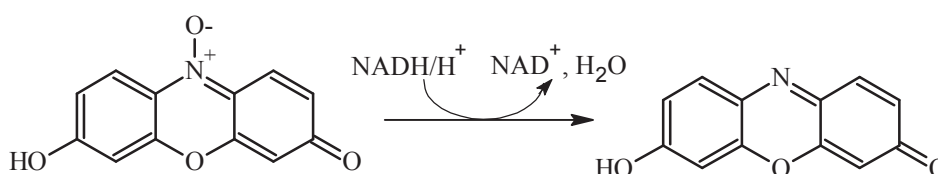


Abb. 5.2.1: Reduktion von Resazurin zu Resorufin unter NADH-Verbrauch

Einen Vorteil dieser Methode stellt die geringe Zytotoxizität des Redoxindikators dar, da Resazurin als e⁻-Akzeptor für Oxidoreduktasen am Ende der Atmungskette fungiert und somit nicht die Zellatmung stört. Andere als Farbstoff benutzte Substrate für mitochondriale Reduktasen wie MTT oder XTT sind weniger sensitiv und werden im Gegensatz zu Resazurin früh in der Atmungskette reduziert, blockieren diese und sind somit selbst toxisch. Nach dem Resazurin-Reduktionstest können die Zellen daher für weitere Versuche verwendet werden, er ist kostengünstig und schnell durchzuführen. Das Reduktionsprodukt kann sowohl photometrisch (Resazurin: 600 nm, Resorufin: 570 nm) als auch fluorimetrisch (Excitation: 530-560 nm, Emission: 590 nm) detektiert werden, wobei letztere Methode deutlich sensitiver ist (Serotec 2003, O'Brien et al. 2000, McMillian et al. 2002, Nakayama et al. 1997).

Durchführung:

Aussäen: Abhängig von der Nachinkubationszeit nach der UVA-Bestrahlung werden in eine 24-Well-Mikrotiterplatte 70.000 (20 h), 25.000 (48 h) oder 10.000 (72 h) V79-Zellen pro Well in 1 ml N-Medium mit Hilfe einer Multipette ausgesät. Wichtig ist dabei gleichmäßiges Arbeiten, da die gemessenen Resorufin-Fluoreszenz-Werte nicht auf Zellzahl oder Proteingehalt normalisiert werden. Grundsätzlich mitgeführt werden pro Platte Leerwerte ohne Zellen, Positiv-, Negativ- und Medium-Kontrollen, jeder Inkubationspunkt wird in einer Doppelbestimmung vermessen, pro Versuch werden zwei identische Platten pipettiert, wovon eine später mit UVA-Licht bestrahlt wird.

Inkubieren: Nach einer Anwachszeit von 24 h wird das Medium mit Hilfe einer stumpfen Braunüle abgesaugt, jedes Well mit 1 ml PBS⁻ gespült und die Zellen mit verschiedenen Substanzen, gelöst in 1 ml S-Medium pro Well, inkubiert. Die Testsubstanzen sind dabei Furocumarine / Limettin in verschiedenen Konzentrationen, als Negativkontrolle dient das Lösungsmittel DMSO, 0,5% Endkonzentration im Medium, als Positivkontrolle Saponin, ein Detergens, 0,1% Endkonzentration im Medium. Nach einer Inkubationszeit von 30 min im Brutschrank wird das Inkubationsmedium abgesaugt, der Zellrasen mit 1 ml PBS⁻ gewaschen und eine der beiden identischen Platten in der UVA-Bestrahlungskammer mit einer definierten UVA-Dosis (50-200 mJ/cm², i.d.R. 125 mJ/cm²) bestrahlt. Anschließend wird pro Well 1 ml N-Medium zugegeben und die Platten für die entsprechende Nachinkubationszeit in den Brutschrank gebracht.

Messung: Unmittelbar vor Gebrauch wird die Resazurin-Arbeitslösung mit auf 37°C vortemperiertem DMEM abgedunkelt hergestellt. Das verbrauchte N-Medium wird abgesaugt, die Zellen pro Well mit 1 ml PBS⁻ gespült, mit 1 ml Resazurin-Arbeitslösung versetzt und die Platte für 1 h im Brutschrank inkubiert. Danach wird die Mikrotiterplatte im Fluoreszenz-Platereader bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm vermessen.

Tab. 5.2.1: Für den Resazurin-Reduktionstest zusätzlich benötigte Lösungen

Lösung	Inhalt	Zusammensetzung
Resazurin-Stammlösung	Resazurin Dimethylformamid Lagerung: 4°C, 1 Woche, dunkel	110,5 mg (440 µmol) 1 ml
NaCl/Pi-Puffer	KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O H ₂ O _{bidest} Lagerung: 4°C	0,144 g (1,1 mmol) 9 g (154 mmol) 0,595 g (3,7 mmol) ad 1 l
Resazurin-NaCl/Pi-Lösung	Resazurin-Stammlösung NaCl/Pi-Puffer Lagerung: 4°C, 4 Wochen, dunkel	100 µl (440 µM) 100 ml
Resazurin-Arbeitslösung	Resazurin-NaCl/Pi-Lösung DMEM low glucose Vor Gebrauch frisch herstellen	10 ml (44 µM) 90 ml

Auswertung des Resazurin-Reduktionstests:

Die Auswertung erfolgt semi-quantitativ. Dazu wird von den gewonnenen Rohdaten der gemittelte Leerwert abgezogen und die verrechneten Rohdaten auf die Mediumkontrolle bezogen; ermittelt wird so die relative Fluoreszenz bzw. die relative Vitalität bezogen auf die Mediumkontrolle:

$$\text{Relative Vitalität } V[\%] = \left(\frac{(M_B - M_L)}{(M_K - M_L)} \right) \times 100$$

Mit: V = relative Vitalität

M_B = Messwert der Behandlung

M_K = Messwert der Kontrolle

M_L = Leerwert

Zur Überprüfung des Testsystems sollten die Werte der Lösungsmittelkontrolle mit der Mediumkontrolle übereinstimmen, die Werte der Positivkontrolle sollten bei 0% liegen.

5.2.2 Neutralrot-Aufnahme-Test

Dieser Zytotoxizitätstest ist ein colorimetrischer Assay, der in den Guidelines verschiedener Experten-Komitees als optimaler Standard zur Testung akuter Phototoxizität beschrieben wird; er ist validiert und wurde als zuverlässig und sachdienlich bewertet (OECD 2004, Spielmann et al. 1994, Spielmann et al. 2000).

Hierbei wird der schwach kationische Farbstoff Neutralrot (NR; 2-Amino-8-dimethylamino-3-methyl-phenazinium Hydrochlorid) über einen nicht-diffusiven Prozess in die Lysosomen lebender Zellen aufgenommen und dort akkumuliert. Durch die Einwirkung von Toxinen können die empfindlichen lysosomalen Membranen durchlässig werden, was in einer verminderten NR-Aufnahme resultiert. Die aufgenommene Farbstoffmenge kann nach dem Herauslösen aus den Zellen colorimetrisch bestimmt werden. So kann quantitativ über eine Kalibriergerade oder semiquantitativ über den Vergleich der Absorption mit der Negativkontrolle das toxische Potential einer Substanz ermittelt werden.

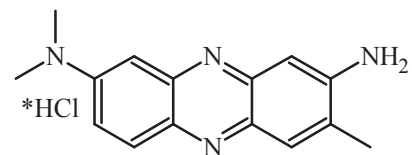


Abb. 5.2.2: Neutralrot

Durchführung:

Die hier verwendete Methode wurde konform zur OECD Test Guideline 432 nach Borenfreund und Puerner (1984 & 1985) unter Variation verschiedener Parameter optimiert.

Tab. 5.2.2: Für den Neutralrot-Aufnahme-Test zusätzlich benötigte Lösungen

Lösung	Inhalt	Zusammensetzung
Neutralrot-Stammlösung	Neutralrot (2-Amino-8-dimethylamino-3-methyl-phenazinium Hydrochlorid) H ₂ O _{bidest} Lagerung: 4°C, 2 Wochen, dunkel	4 mg (440 mmol) 1 ml
Neutralrot-Arbeitslösung	Neutralrot-Stammlösung DMEM low glucose 24 h vor Gebrauch herstellen → Brutschrank	1,25 ml (1:80) 98,75 ml
Desorb-Lösung	H ₂ O _{bidest} Ethanol Essigsäure Vor Gebrauch frisch herstellen	49 ml (49%) 50 ml (50%) 1 ml (1%)

Die Behandlung der Zellen verläuft bis zum Ende der Nachinkubation identisch zum Resazurin-Reduktionstest (5.2.1) im 24-Well-Format.

24 h vor Gebrauch wird die Neutralrot-Arbeitslösung nach Bedarf (1 ml / Well) hergestellt und in 50 ml Falcons in den Brutschrank unter Standardbedingungen gestellt. Kurz vor Gebrauch werden die entstandenen Kristalle mit Hilfe eines 0,2 µm PTFE Spritzenvorsatzfilters entfernt, da sie an den Zellen haften und das Ergebnis verfälschen können.

Nach Ablauf der Nachinkubationszeit wird das verbrauchte N-Medium mit einer stumpfen Braunüle abgesaugt, die Zellen pro Well mit 1 ml PBS⁻ gespült, mit 1 ml Neutralrot-Arbeitslösung versetzt und die Platte für 3 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend (unsteriles Arbeiten möglich) wird die NR-Arbeitslösung abgesaugt, die Wells mit 1 ml PBS⁻ gleichmäßig und zügig gespült, um ein vorzeitiges Herauslösen des Farbstoffs zu verhindern, mit 1 ml Desorb-Lösung versetzt und die Platte auf einem Plattenschüttler 10 min geschüttelt. Danach wird die Platte bei einer Absorptionswellenlänge von 540 nm im Platerader colorimetrisch vermessen.

Auswertung des Neutralrot-Aufnahme-Tests:

Die Auswertung erfolgt semi-quantitativ, kann aber auch bei Bedarf über eine externe Neutralrot-Kalibriergerade quantitativ durchgeführt werden, was hier allerdings keine Vorteile zur semi-quantitativen Auswertung erbracht hat. Dazu wird von den gewonnenen Rohdaten der gemittelte Leerwert (nur Desorb-Lösung) abgezogen und die verrechneten Rohdaten auf die Mediumkontrolle bezogen; ermittelt wird so die relative Absorption bzw. die relative Vitalität bezogen auf die Mediumkontrolle analog:

$$\text{Relative Vitalität } V[\%] = \left(\frac{(M_B - M_L)}{(M_K - M_L)} \right) \times 100$$

Mit: V = relative Vitalität

M_B = Messwert der Behandlung

M_K = Messwert der Kontrolle

M_L = Leerwert

Zur Überprüfung des Testsystems sollten die Werte der Lösungsmittelkontrolle mit der Mediumkontrolle übereinstimmen, die der Positivkontrolle bei 0% liegen.

In der OECD Test Guideline 432 ist die Berechnung des Photo-Irritation-Factor (PIF) zum Vergleich zweier gleich zytotoxischen Konzentrationen einer Chemikalie mit und ohne Bestrahlung empfohlen analog folgender Formel:

$$\text{Photo-Irritation-Factor PIF} = \frac{EC_{50\text{-Bestrahlung}}}{EC_{50\text{+Bestrahlung}}}$$

Zur Interpretation: PIF =	<2	nicht phototoxisch
	>2 und <5	möglicherweise phototoxisch
	>5	phototoxisch

5.2.3 Protein-Bestimmung (Bicinchoninsäure(BCA)-Assay)

Bei dieser Art der Proteinbestimmung handelt es sich um eine sensitive, schnelle und im Vergleich zu anderen Assays weniger störanfällige Methode, den Proteingehalt einer Probe über eine externe Kalibriergerade colorimetrisch zu bestimmen. Hierbei wird die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine in alkalischem Medium (Biuret-Reaktion) kombiniert mit einer Cu^+ -BCA-Komplex-Bildung, welcher stark bei 562 nm absorbiert.

Kupfer wird hier sowohl temperaturunabhängig durch die Oxidation von Cystein-, Cystin-, Tryptophan- und Tyrosin-Resten reduziert, als auch temperaturabhängig durch die Reaktion mit Peptidbindungen (PierceBiotechnologyInc. 2005, Redinbaugh and Campbell 1985, Smith et al. 1985, Wiechelmann, Braun and Fitzpatrick 1988).

Hier wird der Proteingehalt einer Probe als Maß für die Zellproliferation genutzt, da diese mit dem Proteingehalt korreliert ist, um auch Rückschlüsse auf die Zytotoxizität ziehen zu können.

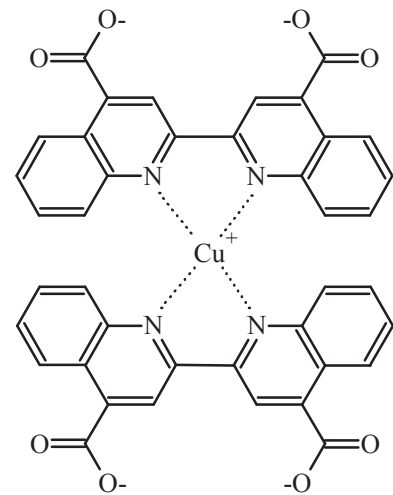


Abb. 5.2.3: Cu^+ -BCA-Komplex

Durchführung:

Die Durchführung erfolgt identisch zum Resazurin-Reduktionstest (5.2.1) im 24-Well-Format bis zum Ende der Nachinkubation. Danach wird das verbrauchte Medium mit einer stumpfen Braunüle abgesaugt, die Zellen mit 1 ml PBS^- gespült, erneut mit 50 μl PBS^- versetzt und bei -80°C in den Biofreezer gestellt. Alternativ können hier die Mikrotiterplatten des Resazurin-Reduktionstests nach der Messung (5.2.1) weiterverwendet werden; statt des N-Mediums wird hier die Resazurin-Arbeitslösung abgesaugt und analog weiter verfahren. Durch insgesamt dreimaliges Einfrieren bei -80°C und mind. 15-minütiges Auftauen bei Raumtemperatur werden die Zellen gecrackt, um alle Proteine zugänglich zu machen.

Die eigentliche Proteinbestimmung erfolgt mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kit (Cat.-Nr. 23225). Aus der BSA-Standardlösung wird eine Verdünnungsreihe von 0-5000 $\mu\text{g/ml}$ erstellt, je 50 μl pro Well (Doppelbestimmung) in eine 24-Well-

Multititerplatte pipettiert und damit wie mit den aufgetauten Probenplatten verfahren: Pro Well werden 400 µl frisch angesetztes Arbeitsreagenz (50:1 Lösung A: Lösung B) zupipettiert. Dabei enthalten Lösung A Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1 M NaOH, Lösung B 4% Kupfersulfat. Nach dem Schütteln der Platten für 30 s auf einem Plattenschüttler werden diese für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 562 nm colorimetrisch vermessen.

Auswertung des BCA-Assays:

Aus der BSA-Verdünnungsreihe wird eine Kalibriergerade berechnet und darüber die jeweilige Proteinmenge in den Wells errechnet. Um die Beziehung zum Resazurin-Reduktionstest und Neutralrot-Aufnahme-Test herzustellen, wird die Proteinkonzentration hier in Prozent der Mediumkontrolle ausgedrückt.

5.3 Methoden zur Erfassung photochemisch induzierter Gentoxizität

In Tab. 5.3 sind zunächst die für alle Testsysteme zur Erfassung photochemisch induzierter Gentoxizität benötigten Lösungen aufgeführt:

Tab. 5.3: Für Gentoxizitätstests allgemein benötigte Lösungen

Lösung	Inhalt	Zusammensetzung
N-Medium	DMEM low glucose FKS Penicillin/Streptomycin Lagerung: 4°C, 4 Wochen	89% (500 ml) 10% (56 ml) 1% (5,6 ml)
S-Medium	DMEM low glucose Penicillin/Streptomycin Lagerung: 4°C, 4 Wochen	99% (500 ml) 1% (5 ml)
PBS ⁺⁺	KCl KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄ H ₂ O _{bidest} Lagerung: RT	0,201 g (2,7 mmol) 0,204 g (1,5 mmol) 8,006 g (137 mmol) 0,923 g (6,5 mmol) ad 1 l pH = 7,4 einstellen
(Furo-)cumarin-Lösungen	(Furo-)cumarin im DMSO; versch. Konzentrationen; max. DMSO-Endkonzentration im Medium: 0,5% Lagerung: substanzabhängig, 4°C oder -20°C	

5.3.1 Photo-*HPRT*-Genmutationstest

Wie bereits unter (2.6.2) näher ausgeführt, wird durch diesen Test das mutagene Potential verschiedener Substanzen über deren Fähigkeit, Vorwärtsmutationen im *hprt*-Gen zu induzieren, charakterisiert. Die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase synthetisiert normalerweise Purinnukleotide aus Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) und Hypoxanthin

oder Guanin. Purinanaloga wie 6-Thioguanin (TG) werden durch HPRT ebenfalls in die DNA oder RNA eingebaut, was zu Störungen in der Struktur und schließlich zum Zelltod führt. Ist die Zelle aufgrund einer Mutation im entsprechenden Struktur- oder Regulatorgen HPRT-defizient, muss sie Purinnukleotide *de novo* synthetisieren, kann also z.B. kein 6-Thioguanosinmonophosphat bilden und ist daher TG-resistent.

Dieses Prinzip wird beim *HPRT*-Genmutationstest ausgenutzt, indem die mit den potentiellen Mutagenen inkubierten Zellen nach Inkubationsende mit 6-Thioguanin-haltigem Selektionsmedium versetzt werden und die Anzahl der gebildeten Kolonien überlebender Zellen als Maß für das mutagene Potential der Substanzen herangezogen wird (Bradley et al. 1981, Glatt 1993, Stout and Caskey 1985, Würgler 1993, Berg and Stryer 2003).

Durchführung:

Die hier verwendete Methode orientiert sich an den Empfehlungen von Bradley et al. (1981), Glatt (1993), O'Brien et al. (2000) und Thielen (2007), mit Modifizierungen einiger Parameter für photochemische Anwendungen u.a. nach Kersten et al. (1999), Stivala et al. (1995), Struwe et al. (2007), Wu et al. (2009), und wurde konform zur OECD Test Guideline 476 etabliert. Da es sich bei Mutationen definitionsgemäß um vererbare Modifikationen der DNA handelt, werden die behandelten Zellen zunächst einige Tage weiter kultiviert und dann eventuelle Mutanten mit TG-haltigem Medium selektiert.

Tab. 5.3.1: Für den Photo-HPRT-Genmutationstest zusätzlich benötigte Lösungen

Lösung	Inhalt	Zusammensetzung
6-Thioguanin-Stammlösung	6-Thioguanin (TG) DMSO Lagerung: RT	9 mg (53,83 mmol) 1 ml
TG-Medium	DMEM low glucose FKS Penicillin/Streptomycin Natriumpyruvatlg. (100mM) TG-Stammlösung Lagerung: 4°C, 4 Wochen	93% (500 ml) 5% (25 ml) 1% (5 ml) 1% (5 ml) 0,1% (0,5 ml) (53 µM)
MNNG-Stammlösung	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG), ca. 50% Wasser H ₂ O _{bidest} frisch ansetzen, da instabil	4,41 mg (20 mmol) 1 ml
NaCl-Lösung	NaCl H ₂ O _{dest} Lagerung: RT	9 g (0,9%) ad 1 l
Methylenblau-Färbelösung	Methylenblau Ethanol Lagerung: RT	2 g (0,5% Vol.) 500 ml

Die Durchführung sei hier der Übersicht halber schematisch nach Tagen aufgeteilt dargestellt:

Tag 1: Zellaussaat

Pro Behandlungspunkt werden 770.000 V79-Zellen in 10 ml N-Medium ausgesät und 24 h anwachsen gelassen.

Tag 2: Inkubation / Bestrahlung

Das verbrauchte N-Medium wird mit einer Pasteurpipette abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS⁻ gewaschen und mit den Testsubstanzen für 30 min in 10 ml S-Medium inkubiert. MNNG (20 µM) dient dabei als Positivkontrolle (Substanz und Konzentration in Vorversuchen als am geeignetsten ermittelt), als Negativkontrollen und zur Überprüfung des Testsystems dienen reines S-Medium, DMSO 0,5% unbestrahlt und mit der verwendeten UVA-Strahlungsdosis (i.d.R. 125 mJ/cm²) bestrahlt und die höchste der getesteten Furocumarin- oder Limettin-Konzentration unbestrahlt. Anschließend wird das Inkubationsmedium abgesaugt, die Platten mit 5 ml PBS⁻ gespült und in der UV-Kammer bestrahlt (0-200 mJ/cm² UVA-Licht). Danach werden sie mit 10 ml N-Medium versetzt und für weitere 24 h in den Brutschrank gestellt.

Tag 3, Tag5: Passagieren

Die Zellen jedes einzelnen Inkubationspunkts werden wie unter 5.1.1 beschrieben mit 1 ml Trypsin von der Kulturschale (Tag 3) bzw. von dem Zellkulturflaschenboden (Tag 5) gelöst, in 8 ml N-Medium resuspendiert und wie unter 5.1.2 erläutert gezählt. Danach werden je 10⁶ Zellen in 15 ml N-Medium erneut in eine Zellkulturflasche ausgesät und für weitere 48 h in den Brutschrank gebracht.

Tag 7: Passagieren / Selektion / „Cloning efficiency“

Die Zellen werden analog zu Tag 5 mit 1 ml Accutase vom Flaschenboden gelöst, in 8 ml N-Medium aufgenommen und gezählt. Wichtig ist hierbei, die Zellen richtig zu vereinzeln, da durch Akkumulation der Zellen nicht nur das Ergebnis der „Cloning efficiency“ (CE) verfälscht werden kann, sondern auch das der Mutationsfrequenz selbst. Während der Selektionsphase kann es so zum Austausch der Nukleotidanaloga zwischen HPRT-pro- und -defizienten Zellen durch sog. Gap junctions kommen, was zum Absterben der HPRT-defizienten Zellen führt. Um dies zu vermeiden wird der FKS-Anteil im Selektionsmedium auf 5% gesenkt (Glatt 1993). Anschließend werden je 10⁶ Zellen in je 15 ml TG-Medium in drei Zellkulturflaschen und zur Überprüfung zytotoxischer Effekte je 240 Zellen in je 10 ml N-Medium auf zwei 94mm-Gewebekulturschalen ausgesät. Realisiert wird letzteres durch eine Verdünnungsreihe: Zunächst wird eine Zellsuspension von 10⁵ Zellen / ml N-Medium hergestellt, wovon 40 µl mit weiteren 960 µl N-Medium verdünnt werden. Davon wieder werden 60 µl in die Gewebekulturschale pipettiert. Die CE ist der Prozentsatz ausgesäter Zellen, die in Kolonien resultieren; dieser sollte optimal bei Negativkontrollen über 90% liegen (Jenssen 1984). Die Zellen werden für weitere neun Tage in den Brutschrank gestellt; ein zwischenzeitlicher Mediumwechsel ist nicht nötig.

Tag 16: Fixieren / Färben

Um die gebildeten Zellkolonien besser erkennen und auswerten zu können, werden sie mit ethanolischer Methylenblaulösung angefärbt. Dazu wird das Medium von den Zellkulturgefäßen abgesaugt (unsteriles Arbeiten möglich), die Kolonien mit 5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung gespült, mit 5 ml vorgekühltem Ethanol versetzt und für mind. 15 min bei -20°C fixiert. Hiernach wird das Ethanol abgesaugt, die Gefäße mit 3 ml

Methylenblaulösung versetzt und für mind. 30 min bei -20°C gefärbt. Danach wird die Färbelösung abgesaugt, die Gefäße so lange vorsichtig mit Leitungswasser gespült, bis das Wasser klar bleibt, und trocknen gelassen.

Auswertung des HPRT-Genmutationstests:

Alle erkennbaren Kolonien in den Zellkulturflaschen und -schalen werden gezählt und für jeden Inkubationspunkt der Mittelwert aus jeweils den Kolonienzahlen der Flaschen und Platten gebildet. Das mutagene Potential einer Substanz wird hier durch die Mutationsfrequenz (MF) ausgedrückt. Zur Vergleichbarkeit der einzelnen MFs errechnet man daraus die auf 10^6 Zellen normierte Anzahl der HPRT-defizienten Zellen unter Berücksichtigung der zytotoxischen Effekte gemäß folgender Formel:

$$\text{Mutationsfrequenz } MF = \frac{MW_{\text{Flasche}} * 240}{MW_{\text{Platte}}}$$

Mit: MF = Mutationsfrequenz (Mutanten / 10^6 Zellen)
MW = Mittelwert

Als mutagen gilt eine Substanz nach Bradley et al. (1981) wenn die beobachtete Mutationsfrequenz mind. dreimal höher ist als die experimentspezifische spontane Mutationsfrequenz MF_0 (= Mutationsfrequenz der Negativkontrolle). In diesem Zusammenhang kann auch der D_{10C} -Wert („mutagenic potency“) berechnet werden, also die Konzentration einer Substanz, die eine Erhöhung der Mutationsfrequenz auf das 10-fache der spontanen Mutationsfrequenz bewirkt, nach folgender Formel:

$$D_{10C} = \frac{10 * MF_0 * K}{MF}$$

Mit: D_{10C} = Substanz-Konzentration, die eine Erhöhung der MF auf das 10-fache der MF_0 bewirkt
MF = Mutationsfrequenz (Mutanten / 10^6 Zellen)
 MF_0 = spontane Mutationsfrequenz
K = Konzentration der Testsubstanz

5.3.2 Photo-Mikrokerntest

Mikrokerne sind, wie unter 2.6.3 näher ausgeführt, chromatinhaltige Partikel, die parallel zum Hauptkern einer Zelle auftreten können und selbst von einer Kernhülle umgeben sind. Sie entstehen durch den Verlust von Chromatinmaterial während der Mitose aus ganzen Chromosomen oder Chromosomenbruchstücken aufgrund verschiedener Wirkmechanismen. So kann mit Hilfe des Mikrokerntests u.a. das gentoxische Potential Doppel- und Einzelstrangbruch induzierender Substanzen, Alkylantien, Spindelgiften, DNA-quervernetzender Substanzen und ROS generierender Substanzen bestimmt und über die Anzahl gebildeter Mikrokerne pro 1000 Zellen ausgedrückt werden.

Durchführung:

Die hier verwendete Methode orientiert sich an den Arbeiten von Lehmann et al. (2006), vereinfacht nach Chopra (2010), und modifiziert für photochemische Anwendungen nach u.a. Kersten et al. (1999 & 2002), Stivala et al. (1995), Struwe et al. (2007); Wu et al. (2009), und wurde konform zur OECD Test Guideline 487 (Draft Proposal) und deren Endfassung 2010 etabliert. Auf den Einsatz von Cytochalasin B wird verzichtet, da die Doppelkernmethode bei der V79-Zelllinie keinen zusätzlichen Nutzen erzielt (Kalweit et al. 1999).

Tab. 5.3.2: Für den Photo-Mikrokerntest zusätzlich benötigte Lösungen

Lösung	Inhalt	Zusammensetzung
MMC-Stammlösung	Mitomycin C H ₂ O _{bidest} Lagerung: -20°C	0,1 mg 1 ml
Carnoy's Fixans	Eisessig Methanol p.a.	25% (25 ml) 75% (25 ml)
DAPI-Stammlösung	4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Methanol p.a. Lagerung: 4°C, 1 Monat	10 mg 1 ml
DAPI-Färbelösung	DAPI-Stammlösung Triton X PBS ⁻ Methanol Lagerung: 4°C, 1 Monat	0,1% (100 µl) 0,1% (100 µl) 49,9% (50 ml) 49,9% (50 ml)

Aussäen: Pro Inkubationspunkt werden auf zwei 60mm-Gewebekulturschalen (Doppelbestimmung) 105.000 V79-Zellen in 4 ml N-Medium ausgesät, für die Positivkontrolle Mitomycin C (MMC, Substanz und Konzentration in Vorversuchen als am geeignetsten ermittelt) 50.000 Zellen / Platte, und 24 h anwachsen gelassen. Als Negativkontrollen und zur Überprüfung des Testsystems dienen analog zum HPRT-Genmutationstest reines S-Medium, DMSO 0,5% unbestrahlt und mit der verwendeten UVA-Strahlungsdosis (i.d.R. 125 mJ/cm²) bestrahlt und die höchste der getesteten Furocumarin- oder Limettin-Konzentrationen unbestrahlt.

Inkubieren: Nach 24 h wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit 4 ml PBS⁻ gewaschen und mit den Furocumarinen und Limettin, gelöst in 4 ml S-Medium, 30 min inkubiert. Danach wird das Inkubationsmedium abgesaugt, der Zellrasen erneut PBS⁻ gespült und mit UVA-Licht (0-200 mJ/cm²) in der UV-Kammer bestrahlt. Als Positivkontrolle wird MMC (0,1 µg/ml) in 4 ml N-Medium 24 h ohne anschließende Bestrahlung auf die Zellen gegeben, wieder abpipettiert und mit PBS⁻ gespült. Danach werden die Zellen wieder mit 4 ml N-Medium versetzt für weitere 20 h, was 1,5 Verdopplungszyklen der V79-Zelllinie entspricht, in den Brutschrank gestellt.

Färben: Nach Ablauf der Nachinkubationszeit werden die Zellen im abgedunkelten Raum fixiert und gefärbt: Dafür wird das Medium abgesaugt (unsteriles Arbeiten möglich), der Zellrasen mit PBS⁻ gewaschen, mit 3 ml vorgekühltem Carnoy's Fixans versetzt und für mindestens 20 min bei -20°C fixiert.

Danach wird das Fixans abpipettiert, die Zellen mit 3 ml DAPI-Färbelösung versetzt und für 10 min bei -20°C gefärbt. Anschließend wird die Färbelösung abpipettiert, die Schale zügig mit 2 ml Methanol gespült und trocknen gelassen.

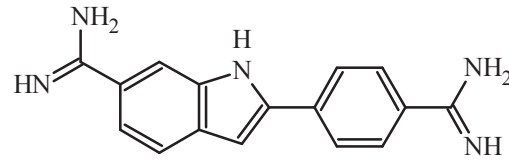


Abb.5.3.2: 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

Sind die Platten getrocknet, werden pro Platte 50 µl in der Mikrowelle verflüssigte Kaiser's Glycerin-Gelatine zugegeben und zügig ein Deckglas möglichst eben aufgedrückt. Abgedunkelt ist die Färbung mindestens 4 Wochen haltbar.

Auswertung des Mikrokerntests:

Die Platten werden unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Immersionsobjektiv bei einer Vergrößerung von 10 x 63 x 1,25 (oil) codiert ausgewertet. Dazu werden pro Schale 1000 Zellen gezählt und die Zahl der mikrokerntragenden Zellen bestimmt; Artefakte, apoptotische, nekrotische oder mitotische Zellen werden dabei ignoriert.

Aus den beiden Platten des gleichen Inkubationspunkts wird der Mittelwert gebildet und in mikrokerntragende Zellen / 1000 ausgedrückt.

Bestimmung der Apoptoserate: Analog zur Mikrokernrate kann auch die Zahl apoptotischer Zellen / 1000 bestimmt werden (vgl. 2.6.3.3/2.4.2.1: Apoptose). Das Chromatin erscheint stark kondensiert, halbmondförmig oder fragmentiert.

5.4 Methoden zur Erfassung der DNA-Interkalation

5.4.1 Interkalation zwischen die Basen der DNA

Wie bereits unter 2.5.5.2.1 erwähnt, interkalieren Furocumarine und Limettin bei Abwesenheit von Licht zwischen die Basen der DNA, hauptsächlich Adenin und Thymin. Generell wird die Ausbildung eines Komplexes zwischen kleinen Molekülen (FCs) und Makromolekülen (DNA) begleitet von Änderungen der spektroskopischen Eigenschaften der kleinen Moleküle. Hier hat der Übergang von dem freien gelösten Molekül zu einem geordneten Komplex einen hypochromen Effekt auf das FC/L-Molekül, der sowohl in dessen Absorptions- als auch Fluoreszenzspektrum gezeigt werden kann. Weiterhin zeigen Furocumarine und Limettin abhängig von der Polarität ihrer Umgebung (Lösungsmittel bzw. in diesem Fall DNA) eine Verschiebung ihrer Absorptionsmaxima. So können Rotverschiebungen ihres langwelligsten Absorptionsmaximums (substanzabhängig ca. 310 – 330 nm) bei einer DNA-Interkalation um bis zu 12 nm auftreten. Somit kann die Bestimmung des hypochromen Effekts bzw. der Rotverschiebung des Absorptionsspektrums der einzelnen Furocumarine in Kombination mit doppelsträngiger DNA Hinweise auf deren Interkalationsverhalten geben (Beaumont et al. 1980, Dall'Acqua et al. 1981, Dall'Acqua et al. 1978, Musajo and Rodighiero 1972, Ou et al. 1976, Ou et al. 1978, Mahler, Kline and Mehrotra 1964, Shim et al. 1987).

Durchführung:

Die hier verwendete Methode orientiert sich an der Arbeit von Ou et al. (1976 & 1978), optimiert für die Anwendung im 96-Well-Format.

Tab. 5.4.1: Für die Erfassung der Interkalation zwischen die Basen der DNA benötigte Lösungen

Lösung	Inhalt	Zusammensetzung
NaPi-Puffer	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O Lagerung: RT	36 mg (0,3 mmol) ad 1 l pH = 7,1 einstellen
DNA-Lösung	Calf thymus DNA (Na ⁺ -Salz, highly polymerized) NaPi-Puffer 24 h vor Gebrauch herstellen Lagerung: 4°C, 1 Tag	1,821 mg (100x53 µM, bez. auf mittl. MW _{Nukleotid}) 1 ml
(Furo-)cumarin-Lösungen	(Furo-)cumarin DMSO Lagerung: substanzabhängig, 4°C oder -20°C	53 mM

Die Herstellung der DNA-Lösung muss sehr vorsichtig vonstatten gehen. Dabei ist zu beachten, dass die Lösung keinesfalls stark geschüttelt wird, um ein physikalisches Zerreißen der DNA-Fäden zu vermeiden.

Zunächst muss die Hälfte der am Vortag hergestellten DNA-Lösung denaturiert werden, um als Einzelstrang-Negativkontrolle dienen zu können. Dazu wird die benötigte Menge in ein verschraubbares 15ml-Falcon überführt, 10 min im kochenden Wasserbad erhitzt und sofort im Eiswasserbad auf 0°C heruntergekühlt. Sowohl von der Doppelstrang-DNA-Lsg. (DNA_{DS}) als auch Einzelstrang-DNA-Lsg. (DNA_{SS}) werden mit NaPi-Puffer Verdünnungen von 100x53 µM auf 75x, 50x, und 25x53µM hergestellt. Die Denaturierung zu einzelsträngiger DNA kann durch den Vergleich der Absorption bei 259 nm mit der doppelsträngigen DNA überprüft werden; hier sollte eine Zunahme zu verzeichnen sein (Beaumont et al. 1980, Mahler et al. 1964).

Pro Substanz, wobei zusätzlich DMSO als Negativkontrolle / Referenzwert dient, wird eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Somit werden pro Substanz je 850 µl Puffer und die verschiedenen DNA-Lösungen in ein 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß vorgelegt und in jedes 0,85 µl der (Furo-)cumarin-Lösung bzw. DMSO pipettiert. Die Gefäße werden nun vorsichtig gewendet, um die DMSO-Stammlösungen gleichmäßig zu verteilen. Aus jedem Mikroreaktionsgefäß werden nun je 200 µl in vier Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (UV-Plate, Fluorocarbon-Folienboden) pipettiert und direkt am Platerader bei 25°C vermessen. Dabei wird von jedem Well ein Absorptionsspektrum von 230-480 nm in 2 nm-Schritten aufgenommen (Ou et al. 1976, Ou et al. 1978, Sigma-Aldrich 2002).

Auswertung:

Da hier die Veränderungen der FC-Spektren in Abhängigkeit der jeweiligen Umgebung des Moleküls untersucht werden sollen, werden die Werte der DMSO-Kontrolle von den entsprechenden Spektren der einzelnen (Furo-)cumarine subtrahiert. Da die Absorptions-Messwerte der (Furo-)cumarine bei kürzeren Wellenlängen durch die starke Eigenabsorption der DNA (λ_{\max} = 259 nm) verfälscht werden, wird zur Auswertung nur das

langwelligste Maximum der einzelnen FCs herangezogen. Verglichen werden sowohl die Wellenlängen des Absorptionsmaximums der FCs in Abhängigkeit der Art und Konzentration der umgebenden DNA als auch die Abnahme der Absorption selbst. Um Verfälschungen durch eine Verschiebung von λ_{\max} auszuschließen, werden die Extinktionen nicht bei einer fixen Wellenlänge, sondern die der jeweiligen Maxima verglichen und in Prozent des Absorptionsmaximums in reinem Puffer ausgedrückt.

5.4.2 Ethidiumbromid- / Hoechst 33258-Kompetitionsassay

Ethidiumbromid (EtBr) ist in der Lage, über die große Furche der DNA zwischen benachbarte Basen der DNA zu interkalieren. Dieser Vorgang erfolgt nur bei doppelsträngiger DNA und resultiert in einer etwa 25-fachen Erhöhung der Fluoreszenz gegenüber dem freien EtBr. Hoechst 33258 (H33258) ist ebenfalls ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich allerdings hauptsächlich in der kleinen Furche der DNA anlagert, wobei sich dieser Komplex mit einer ca. 10-fach höheren Affinität in A/T-reichen Regionen ausbildet (Abu-Daya and Fox 1997, Glazer and Rye 1992, Morgan et al. 1979, Tawar et al. 2003).

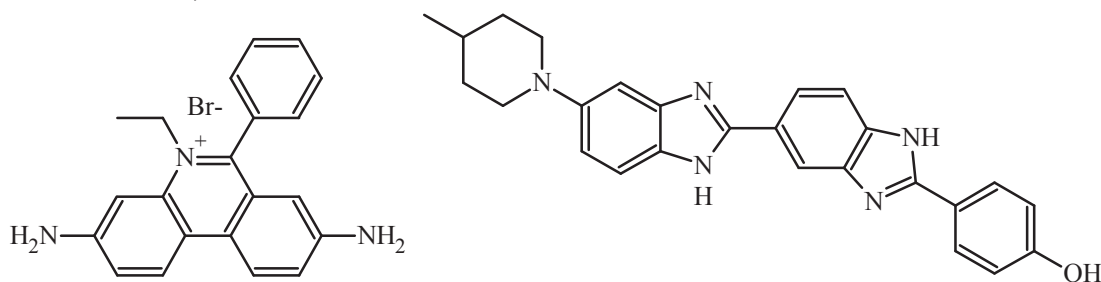


Abb. 5.4.2: Ethidiumbromid (links) und Hoechst 33258 (rechts)

In diesem Assay wird nun das Potential von Substanzen, über die große Furche in die DNA zu interkalieren bzw. sich in der kleinen Furche anzulagern, darüber bestimmt, inwieweit sie fähig sind, EtBr bzw. H33258 aus der DNA zu verdrängen, was in einer Verminderung deren Fluoreszenzintensität resultiert. Die gemessenen Fluoreszenzwerte werden dabei um die Eigenfluoreszenz der zu testenden Substanzen korrigiert.

Durchführung:

Diese Methode orientiert sich an der Arbeit von Morgan et al. (1979), wurde jedoch für die Durchführung im 96-Well-Format optimiert (Habermeyer 2005, Morgan et al. 1979).

Zur besseren Handhabung werden die jeweiligen Gebrauchslösungen mehrfach aufkonzentriert angesetzt; die angegebenen Endkonzentrationen beziehen sich auf die Konzentration der jeweiligen Substanz in der fertig zusammenpipettierten und zu messenden Lösung im Well. Es ist dabei zu beachten, alle Arbeitsschritte, bei denen Furocumarine, Ethidiumbromid, Hoechst 33258, Netropsin oder Actinomycin D involviert sind, im Dunkeln durchzuführen.

Tab. 5.4.2: Für die Erfassung der Interkalation in die große und kleine Furche der DNA benötigte Lösungen

Lösung	Inhalt	Zusammensetzung
Na-Acetat-Puffer	Na-Acetat EDTA NaCl H ₂ O Lagerung: 4°C	164 mg (2 mmol) 37 mg (0,1 mmol) 543 mg (9,3 mmol) ad 1 l pH = 7,0 einstellen
DNA-Stammlsg.	Calf thymus DNA (Na ⁺ -Salz, highly polymerized) Na-Acetat-Puffer 24 h bei 4°C vor Gebrauch herstellen Lagerung: -20°C	2 mg 1 ml
DNA-Gebrauchslsg. (2-fach)	DNA-Stammlsg. Na-Acetat-Puffer	48 µl (Endkonz.: 4,8 µg/ml) 10 ml
(Furo-)cumarin-Stammlsg.	(Furo-)cumarin DMSO Lagerung: Substanzabhängig, 4°C oder -20°C	20 mM
FC-Gebrauchslsg. (4-fach)	FC-Stammlsg. Na-Acetat-Puffer	50/25 µl (4x 200/100 µM) 450/475 µl (Endkonz.: 200/100 µM)
EtBr -Stammlsg.	Ethidiumbromid-Lsg. (10 mg/ml) Na-Acetat-Puffer	19,7 µl (1 mM) 480 ml
EtBr-Gebrauchslsg. (4-fach)	EtBr -Stammlsg. Na-Acetat-Puffer	4 µl (4 µM) 1 ml (Endkonz.: 1 µM)
Hoechst 33258-Stammlsg.	Hoechst 33258 (Bis-Benzimid-Trihydrochlorid) H ₂ O _{bidest}	25 mg (1 mmol) 46,83 ml
Hoechst 33258-Gebrauchslsg. (4-fach)	Hoechst 33258-Stammlsg. Na-Acetat-Puffer	4 µl (4 µM) 1 ml (Endkonz.: 1 µM)
Netropsin-Stammlsg.	Netropsin DMSO	5 mg (2 mmol) 4,966 ml (Endkonz.: 0 – 10 µM)
Actinomycin D-Stammlsg.	Actinomycin D DMSO	2 mg (1 mmol) 1,593 ml (Endkonz.: 0 - 20 µM)

Pro 96-Well-Platte können zehn verschiedene Substanzen bzw. Substanzkonzentrationen bestimmt werden. Abb. 5.4.2 zeigt ein typisches Pipettierschema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B	N	K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C	N	K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
D	N	K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
E	N	K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
F	N	Kef	1ef	2ef	3ef	4ef	5ef	6ef	7ef	8ef	9ef	10ef
G	N	Kef	1ef	2ef	3ef	4ef	5ef	6ef	7ef	8ef	9ef	10ef
H	N	Kef	1ef	2ef	3ef	4ef	5ef	6ef	7ef	8ef	9ef	10ef

Abb. 5.4.2: Pipettierschema einer 96-Well-Platte für den Ethidiumbromid / Hoechst 33258 - Kompetitionsassay

Dabei bedeuten:

N = Nullwert: 150 µl Puffer + 50 µl 4-fach EtBr- / H33258-Gebrauchslösung (4 x 1 µM)

K = Kontrollwert: 100 µl 2x DNA, 50 µl 4-fach EtBr- / H33258-Gebrauchslösung (4 x 1 µM), 50 µl 4-fach DMSO-Gebrauchslösung

1-10 = Substanzkonz.: 100 µl 2x DNA, 50 µl 4-fach EtBr- / H33258-Gebrauchslsg. (4 x 1 µM), 50 µl 4-fach FC-Gebrauchslsg.

ef = Eigenfluoreszenz: 100 µl Puffer, 50 µl 4-fach EtBr- / H33258-Gebrauchslösung (4 x 1 µM), 50 µl 4 x 4-fach FC-Gebrauchslsg.

Der Nullwert bezeichnet hierbei die Eigenfluoreszenz von Ethidiumbromid bzw. Hoechst 33258, als Negativ-Kontrolle dient hier DMSO, als Positivkontrollen Actinomycin D (0 – 20 µM, Ethidiumbromid) bzw. Netropsin (0 – 10 µM, Hoechst 33258). Zusätzlich wird die mögliche Eigenfluoreszenz der Substanzen ermittelt, die das Ergebnis eventuell verfälschen könnte.

Die Lösungen werden in der angegebenen Reihenfolge in die Wells pipettiert und nach Einstellung des Gleichgewichts nach 10 min fluorimetrisch mit folgenden Anregungs- / Emissions-Wellenlängen am Platerader vermessen:

Ethidiumbromid: Ex: 545 nm, Em: 595 nm

Hoechst 33258: Ex: 355 nm, Em: 460 nm

Auswertung:

Die Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Messpunkte werden gemittelt und nach folgender Formel um die Eigenfluoreszenz korrigiert:

$$FI_{Substanz} = MW(FI_{i,Subst.+DNA}) - MW(FI_{ef,i,Subst.})$$

Mit: $FI_{Substanz}$ = gemittelte und korrigierte Fluoreszenzintensität der Substanz

$FI_{i,Subst.+DNA}$ = einzelne Fluoreszenzintensitäten der Substanz mit DNA

$FI_{ef,i,Subst.}$ = einzelne Eigenfluoreszenzintensitäten der Substanz ohne DNA

Soll die Auswertung semi-quantitativ durchgeführt werden, dient der Nullwert als 0%-Wert, der Kontrollwert mit dem Lösungsmittel DMSO als 100%-Wert.

Sind die zu untersuchenden Substanzen potente Verdränger von Ethidiumbromid bzw. Hoechst 33258, lassen sich zum besseren Vergleich aus den Auftragungen der Fluoreszenz gegen die Substanzkonzentration EC_{50} -Werte berechnen, bei denen die Fluoreszenzintensität um 50% vermindert ist.

5.5 Methoden zur Erfassung photochemisch gebildeter ROS

Beide hier vorgestellten Methoden zur Detektion photochemisch gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Furocumarine in Kombination mit UVA-Licht erfolgen zellfrei und wurden für die Durchführung im 96-Well-Format optimiert.

5.5.1 Detektion von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)

Die hier nach Kraljic und El Mohsni (1978) und Pathak und Joshi (1984) etablierte und modifizierte Methode detektiert indirekt, aber spezifisch Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) über das Bleichen von *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin, welches als selektiver $^1\text{O}_2$ -Radikalfänger fungiert. Histidin wird als $^1\text{O}_2$ -Akzeptor eingesetzt und reagiert unter Bildung einer trans-annularen Zwischenstufe ([HistidinO₂]), die nur in Gegenwart von $^1\text{O}_2$ entsteht, zum zyklischen Endoperoxid. Der gelbe Farbstoff *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin wird nun über diese Zwischenstufe zu farblosen Produkten oxidiert. Überprüft wurde die Spezifität u.a. durch den Einsatz von Azidionen oder 1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan (Bode 2004, Kraljic 1986, Kraljic and El Mohsni 1978, Pathak and Joshi 1984).

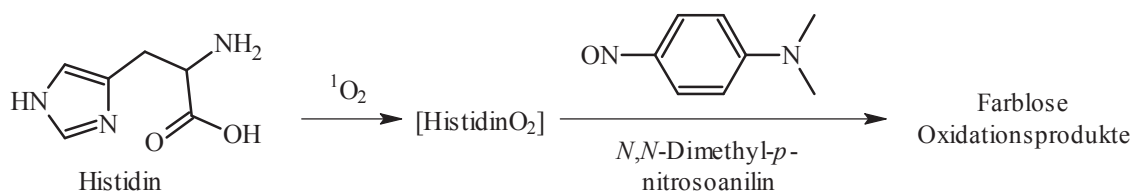


Abb. 5.5.1: Entfärbung von *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin als indirekter Nachweis von $^1\text{O}_2$

Tab. 5.5.1: Für die Detektion von Singulett-Sauerstoff benötigte Lösungen

Lösung	Inhalt	Zusammensetzung
Na ⁺ /K ⁺ -Puffer (10 mM)	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ H ₂ O _{bidest} Lagerung: 4°C, 1 Woche	694,1 mg (5,1 mmol) 681,4 mg (4,8 mmol) ad 1 l pH = 7,0 einstellen (H ₃ PO ₄)
L-Histidin-Lösung	L-Histidin Na ⁺ /K ⁺ -Puffer	15,516 mg (0,1 mol) 1 ml
<i>N,N</i> -Dimethyl- <i>p</i> -nitrosoanilin-Lösung	<i>N,N</i> -Dimethyl- <i>p</i> -nitrosoanilin Na ⁺ /K ⁺ -Puffer	3,0036 mg (0,4 mmol) 50 ml
(Furo-)cumarin-Lösungen	(Furo-)cumarin H ₂ O _{bidest} Lagerung: -20°C	entsprechend 1mM Hergestellt aus DMSO-Stamm-Lsg., normiert auf 1,5% DMSO

Durchführung:

Für jede Substanz, auch DMSO, da die hier verwendeten Furocumarinlösungen aus DMSO-Stammlösungen angesetzt wurden, wird ein 1,5 ml Mikro-Reaktionsgefäß (Eppi) vorbereitet, in das folgende Lösungen pipettiert werden; als Positivkontrolle dient hier Psoralen:

- 748 µl Na⁺/K⁺-Puffer
- 85 µl L-Histidin-Lösung (Endkonzentration: 10 mM)
- 8,5 µl *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin-Lösung (Endkonzentration: 4 µM)
- 8,5 µl (Furo-)cumarin-Lösung (Endkonzentration: 10 µM)

Von dieser Lösung werden pro Substanz in Vierfachbestimmung je 200 µl pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend im Plattenreader die Absorption bei 440 nm gemessen.

Danach wird die Platte in der Bestrahlungskammer mit steigenden UVA-Dosen bestrahlt, bis eine Gesamt-Strahlungsdosis von 35 J/cm² erreicht ist, wobei die Absorption nach jeder Einzeldosis neu vermessen wird.

Auswertung:

Die gemessenen Absorptionswerte werden für jede Substanz und Strahlungsdosis gemittelt, die jeder Messung vorausgegangenen Strahlungsdosen addiert und die Absorption als Funktion der UVA-Dosis graphisch aufgetragen. Da *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin eine gewisse Eigenbleichung unter UVA-Licht zeigt, werden die Messwerte außerdem gegen die Eigenbleichung korrigiert. Hierzu wird die ohne Bestrahlung gemessene Absorption auf 100% gesetzt und im zeitlichen Verlauf die Differenz zwischen Anfangs- und aktueller Absorption der DMSO-Kontrolle zu den Messwerten der Substanzen addiert:

$$\text{Relative Absorption } A[\%] = \frac{MW_{\text{Subst}(E)}}{MW_{\text{Subst}(A)}} \times 100 + \frac{MW_{\text{DMSO}(A)}}{MW_{\text{DMSO}(A)}} \times 100 - \frac{MW_{\text{DMSO}(E)}}{MW_{\text{DMSO}(A)}} \times 100$$

Mit: $MW_{\text{Subst}(A)}$ = Absorptionsmittelwert der Testsubstanz-Wells unbestrahlt
 $MW_{\text{Subst}(E)}$ = Absorptionsmittelwert der Testsubstanz-Wells bei gegebener UVA-Dosis
 $MW_{\text{DMSO}(A)}$ = Absorptionsmittelwert der DMSO-Wells unbestrahlt
 $MW_{\text{DMSO}(E)}$ = Absorptionsmittelwert der DMSO-Wells bei gegebener UVA-Dosis

Zum besseren Vergleich der ¹O₂-Produktion werden zusätzlich die relativen Absorptionswerte nach einer Strahlungsdosis von 25 J/cm² angegeben.

5.5.2 Detektion von Superoxidradikalanionen (O₂^{•-})

Die hier nach Beauchamp und Fridovich (1973) und Kirby und Fridovich (1982) etablierte und modifizierte Methode detektiert spezifisch, aber ebenfalls indirekt die durch Furocumarine in Kombination mit UVA-Licht entstehenden Superoxidradikalanionen (O₂^{•-}). Der hierbei eingesetzte gelbe Farbstoff Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid (NBT) wird durch O₂^{•-} selektiv zu dem blauen Formazan (FMZ) reduziert. Die Selektivität wurde vielfach in der Literatur bestätigt durch den Einsatz der Referenzsubstanzen Benzoylperoxid und Riboflavin, was auch hier als Positivkontrolle eingesetzt wird, oder durch die Verwendung von Superoxid-Dismutase (SOD) als Quencher (Beauchamp and Fridovich 1973, Kirby and Fridovich 1982, Moore and Wang 1998, Pathak and Joshi 1984).

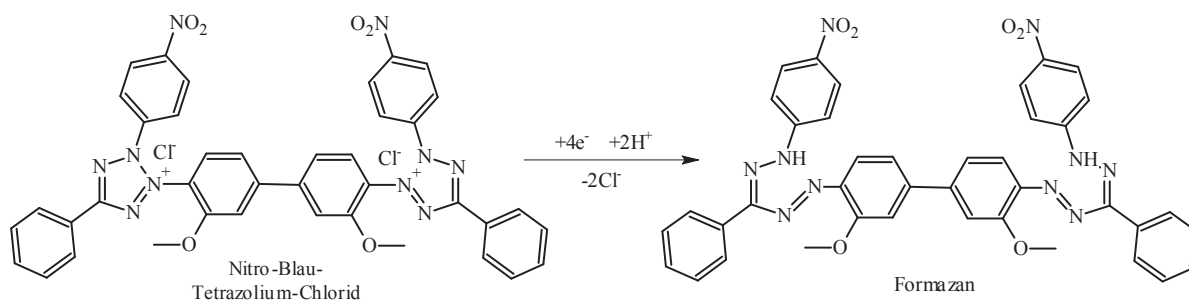


Abb. 5.5.2: Reduktion von NBT zu FMZ

Zusätzlich haben Korycka-Dahl and Richardson (1977) gezeigt, dass Methionin die Bildung von $O_2^{\bullet -}$ erhöht. Dies scheint allerdings in Wahrheit auf die zusätzliche Reduktion von NBT durch einen direkten Elektronentransfer von einem angeregten Photosensibilisator ohne $O_2^{\bullet -}$ -Beteiligung zurückzuführen zu sein, wobei Methionin als Elektronendonator fungiert. Die dabei entstehenden Methionin-Kationen werden anschließend in radikalischen Folgereaktionen unter Sauerstoffanlagerung bis zum Methionin-Sulfoxid oxidiert (Cooper 1981, Dean et al. 1997, Korycka-Dahl and Richardson 1977, Moore and Wang 1998).

Tab. 5.5.2: Für die Detektion von Superoxidradikalanionen benötigte Lösungen

Lösung	Inhalt	Zusammensetzung
K ⁺ -Puffer (10 mM)	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ H ₂ O _{bidest} Lagerung: 4°C, 1 Woche	0,177 g (1,3 mM) 1,498 g (8,6 mM) ad 1 l pH = 7,8 einstellen (H ₃ PO ₄)
L-Methionin-Lösung	L- Methionin K ⁺ -Puffer	14,921 mg (0,01 M) 10 ml
Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid-Lösung	Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid K ⁺ -Puffer	6,132 mg (1,5 mM) 5 ml
Riboflavin-Lösung	Riboflavin K ⁺ -Puffer	0,376 mg (1 mM) 1 ml
(Furo-)cumarin-Lösungen	(Furo-)cumarin H ₂ O _{bidest} Lagerung: -20°C	entsprechend 1mM

Durchführung:

Für jede Substanz, auch DMSO, da die hier verwendeten Furocumarinlösungen aus DMSO-Stammlösungen angesetzt wurden, wird ein 1,5 ml Mikro-Reaktionsgefäß (Eppi) vorbereitet, in das folgende Lösungen pipettiert werden:

- 714 µl K⁺-Puffer
- 42,5 µl L-Methionin-Lösung (Endkonzentration: 500 µM)
- 85 µl Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid-Lösung (Endkonzentration: 150 µM)
- 8,5 µl (Furo-)cumarin- bzw. Riboflavin-Lösung (Endkonzentration: 10 µM)

Von dieser Lösung wird pro Substanz in Vierfachbestimmung je 200 µl pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend im Plattenreader die Absorption bei 560 nm gemessen.

Danach wird die Platte in der Bestrahlungskammer mit steigenden UVA-Dosen bestrahlt, bis eine Gesamt-Strahlungsdosis von 25 J/cm² erreicht ist, wobei die Absorption nach jeder Einzeldosis neu vermessen wird.

Auswertung:

Die gemessenen Absorptionswerte werden für jede Substanz und Strahlungsdosis gemittelt, die jeder Messung vorausgegangenen Strahlungsdosen addiert und die Absorption als Funktion der UVA-Dosis graphisch aufgetragen. Die Messwerte der einzelnen Proben bei verschiedenen UVA-Dosen werden gegen die schwache, L-Methionin-vermittelte bzw. durch die möglicherweise von DMSO gebildeten O₂^{•-} erreichte Reduktion von NBT verrechnet, indem die Messwerte der DMSO-Kontrolle entsprechend subtrahiert werden.

$$\text{Absorption } A = MW_{\text{Subst}} - MW_{\text{DMSO}}$$

Mit: MW_{Subst} = Absorptionsmittelwert der Testsubstanz-Wells

MW_{DMSO} = Absorptionsmittelwert der DMSO-Wells

Zum besseren Vergleich der O₂^{•-}-Produktion werden zusätzlich die relativen Absorptionswerte nach einer Strahlungsdosis von 10 J/cm² angegeben, da bei höheren Strahlungsdosen die Absorption der Positivkontrolle wieder rückläufig ist.

5.6 Statistik

Die Ergebnisse werden, soweit nicht anders angegeben, als Mittelwerte ± Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Dies bedeutet in Bezug auf Versuche mit V79-Zellen, dass mind. drei unabhängige Passagen verwendet wurden; bei zellfreien Versuchen wurden benötigte Lösungen dreimal neu angesetzt.

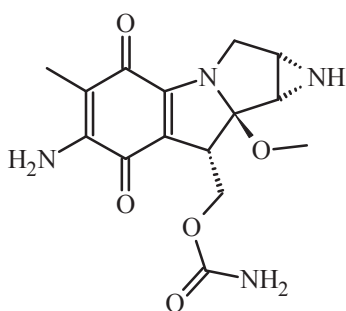
Die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichungen erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2003, die der EC₅₀-Werte, der linearen Regressionen und der 95% Konfidenzintervalle über OriginPro 7.5.

Zur Bestimmung statistischer Signifikanzen wurde das Programm InStat 3 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) verwendet. Dabei wurde zum Vergleich von mindestens zwei behandelten Gruppen mit der Kontrollgruppe eine *one-way analysis of variance* (*one-way* ANOVA) in Kombination mit *Dunnett's post test* durchgeführt. Dabei untersucht die *one-way* ANOVA die von einem Faktor (hier: Konzentration der Testsubstanz) abhängigen Effekte zwischen drei und mehr Gruppen, wohingegen *Dunnett's post test* statistische Signifikanzen zwischen der Kontrollgruppe und mehreren Behandlungsgruppen ermittelt. Dabei bedeuten * statistisch signifikant ($P \leq 0,05$), ** statistisch sehr signifikant ($P \leq 0,01$).

Zum direkten Vergleich zweier Gruppen (hier: bestrahlte und unbestrahlte Proben) wurde ein *unpaired student's t-test, Welch corrected*, zu Berechnung des *two-tail P Wertes* herangezogen, da von verschiedenen Standardabweichungen auszugehen ist. Dabei bedeuten # statistisch signifikant ($P = 0,05-0,01$), ## statistisch sehr signifikant ($P = 0,01-0,001$), ### statistisch höchst signifikant ($P \leq 0,001$).

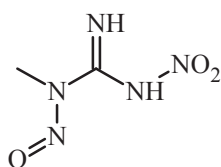
5.7 Positivkontrollen

Mitomycin C



Das als Antibiotikum eingesetzte Mitomycin C wird von den Arten *Streptomyces caespitosus* und *Streptomyces verticillatus* der Gattung der Actinobacteria gebildet. Dessen zytotoxische und clastogene Effekte werden durch Interkalation des kurzlebigen, teilweise reduzierten MMC (vermutlich Semichinon-Radikal) mit anschließender kovalenter Bindung an O⁶ oder 2-Aminogruppe der Guaninnukleotide oder der 6-Aminogruppe von Adennukleotiden verursacht, da so Strangbrüche am 3'-Ende induziert werden. Durch die Fähigkeit, Kinetochor-Proteine abzulösen, wirkt MMC auch aneugen (Dellarco, Mavournin and Tice 1985, Ueda and Komano 1984). Mitomycin C wird im Rahmen des Mikrokerntests als Positivkontrolle eingesetzt.

N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG)



N-Methyl-*N'*-Nitro-*N*-Nitrosoguanidin (MNNG) ist ein schwach gelber bis rosafarbener, kristalliner Feststoff, der sich gut in polaren Lösungsmitteln (z.B. DMSO) löst, allerdings eine geringe Wasserlöslichkeit besitzt und sich dort unter Bildung nitroser Gase zersetzt. Es gehört zur Gruppe der *N*-Nitrosoharnstoffe und ist ein hochpotentes Kanzerogen (Kategorie 1). Es wird durch intrazellulär vorhandenes GSH aktiviert und wirkt als Alkylans; hauptsächlich entstehen MNNG-Addukte an N⁷-Guanin, aber auch N³-Adenin, O⁶-Guanin oder den Phosphat-Gruppen des DNA-Rückgrats. Es wird im HPRT-Mutationsassay als Positivkontrolle eingesetzt, wo seine mutagene Wirkung vermutlich auf nicht reparierte DNA-Schäden und promutagene O⁶-Guanin-Addukte zurückzuführen ist (Beranek, Weis and Swenson 1980, Bradley et al. 1981, GisChemBGRCI 2010, Lawley and Thatcher 1970).

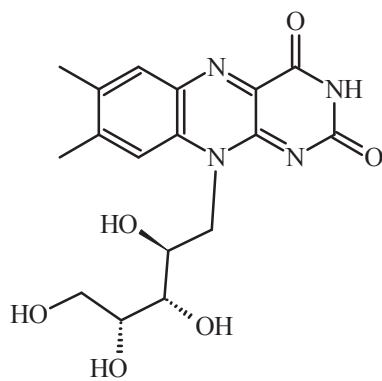
Saponin

Saponin ist eine heterogene Mischung aus Saponinen der Seifenwurz und der Panamarinde mit großen Varianzen innerhalb der Aglycone als auch der Zucker; Hauptbestandteil ist Sapogenin mit 20-35%. Hierbei handelt es sich um Detergenzien, die sowohl in der Textilindustrie als auch in der Molekularbiologie zur Permeabilisierung von Zellmembranen eingesetzt werden (Behler 2006, Jalal et al. 1992).

UVC-Strahlung

UVC-Licht ist elektromagnetische Strahlung der Wellenlänge 200 - 280 nm, womit das Absorptionsmaximum der DNA mit 259 nm genau in diesem Bereich liegt. So induziert UVC-Strahlung spezifische DNA-Schäden wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und (6-4)-Pyrimidin-Pyrimidon-Dimere, über die wiederum späte Apoptosen über p53 induzieren. Weiterhin können über das Cross-Linking gewisser Todesrezeptoren wie FasR oder über die Bildung von Superoxid-Anionen mittelfrühe Apoptosen ausgelöst werden (vgl. 2.3) (Diffey 1991, Batista et al. 2009, Roza, van der Schans and Lohman 1985, Godar 1999).

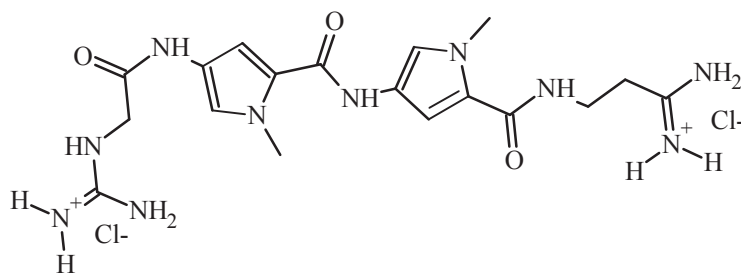
Riboflavin



Riboflavin, auch bekannt als Vitamin B₂, wird von Pflanzen und Mikroorganismen, nicht jedoch von Menschen oder Tieren, aus Purin-Vorstufen (Guanosin) aufgebaut und bildet in Form des Flavin-Adenin-Dinucleotids (FAD) und des Flavinmononucleotids (FMN) die Coenzyme der Flavoproteine. Unter Einwirkung von UVA-Licht und in Gegenwart von Sauerstoff ist Riboflavin ein sehr starker Produzent von Superoxidradikalanionen ($O_2^{\bullet-}$), kann aber auch weniger stark Singulett-Sauerstoff (1O_2) generieren. So wird es z.B. in der Keratokonus-

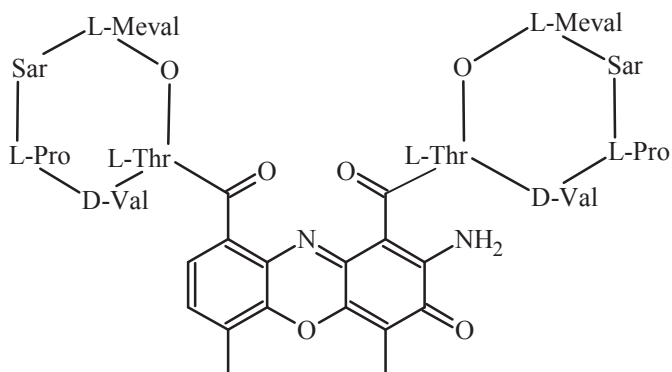
Behandlung eingesetzt, da durch $O_2^{\bullet-}$ Quervernetzungen der Kollagenfasern über Ausbildung einer Schiffischen Base induziert werden (Kühn 1974, Möseneder 2006, Pathak and Joshi 1984, Wollensak, Spörl and Seiler 2003).

Netropsin



Netropsin ist ein von *Streptomyces netropsis* gebildetes Oligopeptid, das sich in A/T-reiche Regionen doppelsträngiger DNA anlagert, besonders in die kleine Furche. Daher schützt es diese Regionen vor DNAase I und

anderen Endonucleasen und inhibiert die Topoisomerasen I & II. Weiterhin stört es den Zellzyklus, indem es die G1-Phase verlängert bzw. einen G2-Arrest induziert (Abu-Daya and Fox 1997, Poot et al. 1990, Poot et al. 1995, Zimmer, Luck and Nuske 1980, Bailly 2000).

Actinomycin D

Das antineoplastische Antibiotikum Actinomycin D, das von *Streptomyces spectabilis* synthetisiert wird, bildet über Interkalation mit dem planaren Teil seiner Struktur einen stabilen Komplex mit der DNA aus. So behindert es z.B. die RNA-Polymerase oder stört die Struktur der DNA, was bei der Interaktion mit der Topoisomerase I zu einer Stabilisierung des Cleavable

Complex führt. Weiterhin induziert Actinomycin D Apoptosen und ist ein potentes Antitumor-Medikament (Bailly 2000, Chen, Liu and Patel 1996, Glynn, Cotter and Green 1992). In der Abbildung bedeuten: L-Pro: L-Prolin, D-Val: D-Valin, L-Thr: L-Threonin, L-Meval: L-Methylvalin, Sar: Sarcosin

6 Ergebnisse

6.1 Allgemeines

Zunächst wurden mit Hilfe von 5-Methoxypsoralen (5-MOP) geeignete Phototoxizitäts- und Photogentoxizitäts-Methoden etabliert und validiert, um anschließend verschiedene Furocumarine und das Cumarin Limettin hinsichtlich ihrer relativen phototoxischen und photogentoxischen Potenz untersuchen zu können.

Hiernach wurden alle Furocumarine zunächst als Reinsubstanzen in den Zellkultur-basierenden Testsystemen (Resazurin-Reduktionstest, HPRT-Genmutationstest, Mikrokerntest (MNA)) untersucht, die Dosis-Wirkungsbeziehungen sowohl unter Lichtausschluss als auch in Kombination mit UVA-Licht ermittelt und die Phototoxizität und Photogentoxizität am Beispiel von 5-Methoxypsoralen in V79-Zellen näher charakterisiert.

Die in diesen Versuchen verwendeten Furocumarinkonzentrationen im Inkubationsmedium sind alle in der Einheit $\mu\text{g/ml}$ hergestellt worden, da die hier vorliegende Arbeit Hilfestellung zur Bewertung natürlich vorkommender Furocumarinegemische leisten soll, die in der Literatur im Allgemeinen in Gewicht pro Volumen oder pro Gesamtgewicht quantifiziert werden. Zur besseren Vergleichbarkeit werden die beobachteten Effekte allerdings zusätzlich in molaren Einheiten angegeben. Diese Effekte werden nun mit denen des potentesten getesteten Furocumarins, 5-MOP, ins Verhältnis gesetzt und daraus Phototoxizitäts- (Resazurin-Reduktionstest), Photomutagenitäts- (HPRT-Assay) und Photoclastogenitäts- (MNA) Äquivalenzfaktoren (PTEF, PMEF, PCEF) berechnet.

Um das Verhalten von Furocumarinen in Mischungen zu charakterisieren, wurden danach aus den Reinsubstanzen verschiedene, mitunter komplexe Mischungen hergestellt. Die Konzentrationen der Mischungen wurden dabei so gewählt, dass ihre Testung zunächst unter Annahme strikt additiven Verhaltens (vgl. 2.2.1) der Einzelkomponenten nicht von zytotoxischen Effekten beeinflusst werden sollte. Tab. 6.1 gibt eine Übersicht über alle verwendeten FC-Mischungen; die angegebenen Konzentrationen sind als 100%-Konzentrationen im fertigen Inkubationsmedium zu verstehen, die zur Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehungen auf bis zu 10% herunter verdünnt bzw. für den Resazurin-Reduktionstest zur Ermittlung der zytotoxischen Effekte auf bis zu 1000% aufkonzentriert wurden, abhängig von der jeweiligen Löslichkeitsgrenze. Unter „Angelika“ ist hier ein ethanolischer Extrakt (31%) der Wurzeln von *Angelica archangelica* zu verstehen, bei dem die Furocumarinkonzentrationen des reinen Extrakts angegeben sind und der selbst bis 2,5% (HPRT-Assay) bzw. 10% (Resazurin-Test) verdünnt im Inkubationsmedium verwendet wurde.

Tab. 6.1: In den Zellkulturexperimenten verwendete Furocumarin-Mischungen

Mischung	Enthaltene Furocumarine	Konzentration
Mix 1	5-MOP	1 µg/ml
	8-MOP	4 µg/ml (MNA: 5 µg/ml)
Mix 2	5-MOP	1 µg/ml
	8-MOP	4 µg/ml (MNA: 5 µg/ml)
Mix 3	Limettin	50 µg/ml
	Imperatorin	10 µg/ml
	Angelicin	30 µg/ml
Mix 4	Imperatorin	5 µg/ml
	Angelicin	15 µg/ml
	8-MOP	2 µg/ml
	Limettin	25 µg/ml
Mix 5	5-MOP	1,5 µg/ml
	8-MOP	3 µg/ml
Mix 6	5-MOP	0,5 µg/ml
	8-MOP	6 µg/ml
Mix 7	6',7'-Dihydroxybergamottin (DHB)	2,5 µg/ml
	Epoxybergamottin	2,5 µg/ml
	Oxypeucedanin	2,5 µg/ml
	Oxypeucedaninhydrat	2,5 µg/ml
Mix 8	5-MOP	0,2 µg/ml
	8-MOP	0,8 µg/ml
	6',7'-Dihydroxybergamottin (DHB)	1 µg/ml
	Epoxybergamottin	1 µg/ml
	Heraclenin	4 µg/ml
	Imperatorin	2 µg/ml
	Oxypeucedanin	1 µg/ml
	Oxypeucedaninhydrat	1 µg/ml
	Sphondin	2 µg/ml
Angelika	5-MOP	57,4 µg/ml
	8-MOP	26,9 µg/ml
	Byakangelicin	56,1 µg/ml
	Imperatorin	29,3 µg/ml
	Isopimpinellin	37,9 µg/ml
	Oxypeucedaninhydrat	343,9 µg/ml
	Phellopterin	21,6 µg/ml

Um nun eventuelle Abweichungen vom postulierten strikt additiven Verhalten feststellen zu können, wurden drei Ansätze verfolgt (vgl. 2.2.2):

Erstens wurde die isobolographische Analyse angewandt. Dabei wurden verschiedene Mischungen zweier Komponenten unterschiedlicher Mengenverhältnisse getestet und die resultierenden Effekte mit der Isobole der Reinsubstanzen graphisch verglichen. Da dies eine extrem arbeitsaufwändige Methode ist, wurde sie nur exemplarisch an Mischungen von 5-MOP und 8-MOP durchgeführt.

Zweitens wurde für alle Mischungen der Interaktions-Index CI bei verschiedenen Effekten (z.B. EC_{50} -Wert oder Mutationsfrequenz = $100 \cdot 10^{-6}$) berechnet und auf mögliche Abweichungen von 1 untersucht.

Drittens wurden die Phototoxizitäts- (Resazurin-Reduktionstest), Photomutagenitäts- (HPRT-Assay) und Photoclastogenitäts- (MNA) Äquivalente (PTEQ, PMEQ, PCEQ) einer Mischung berechnet und graphisch gegen die dazugehörigen gemessenen Effekte aufgetragen. Diese Auftragung wird nun mit der Dosis-Wirkungs-Kurve des Index-Stoffes 5-MOP verglichen, der sie bei der Anwendbarkeit des Konzepts entsprechen soll.

Weiterhin wurde, soweit möglich, nach der von Cassee und Pösch vorgestellten Methode am Beispiel von 5-MOP und 8-MOP untersucht, ob es sich bei der zugrundeliegenden Additivität um eine Dosis- oder Effekt-Additivität handelt (Cassee et al. 1998, Pösch, Dittrich and Holzmann 1990, Pösch and Holzmann 1980).

Abschließend wurden Untersuchungen zum Absorptions- und DNA-Interkalations-Verhalten der getesteten Furocumarine und deren Potential zur Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff (1O_2) und Superoxidradikalanionen ($O_2^{\cdot-}$) durchgeführt. Dies geschah zum einen zur Überprüfung, inwieweit andere Effekte bei der Verallgemeinerung der exemplarisch an 5-MOP und 8-MOP gezeigten Additivität für andere Furocumarine eventuell mit einbezogen werden müssen. Zum anderen dienten diese Tests zur Überprüfung möglicher Ursachen für die gezeigten Reaktivitätsunterschiede der einzelnen Furocumarine.

6.2 Phototoxizität: Charakterisierung am Beispiel von 5-MOP und Etablierung einer geeigneten Methode

Zur Erfassung der Phototoxizität der zu untersuchenden Furocumarine und Limettin sollte am Beispiel von 5-Methoxypsoralen (5-MOP) eine geeignete Methode gefunden werden. Die ideale Nachinkubationszeit nach der Bestrahlung sowie eine geeignete UVA-Strahlungsdosis selbst sollten dabei bestimmt werden. Die Methode sollte sowohl zuverlässig und zweckdienlich als auch in Hinblick auf den Probenumfang einfach, schnell und kostengünstig durchzuführen sein. Verglichen wurden hierfür folgende drei Methoden:

1. Neutralrot-Aufnahme-Test, der von der OECD als Phototoxizitätstest empfohlen wird und die lysosomale Integrität und Aktivität als Zytotoxizitäts-Parameter quantifiziert (OECD 2004).
2. Resazurin-Reduktionstest, bei dem die Umsetzung von Resazurin zu Resorufin als Maß für die mitochondriale Aktivität dient (O'Brien et al. 2000, Serotec 2003).
3. Bicinchoninsäure(BCA)-Assay, über den der Gesamt-Protein-Gehalt bestimmt wird und somit auf die Proliferationsrate geschlossen werden kann (PierceBiotechnologyInc. 2005, Redinbaugh and Campbell 1985).

Die verschiedenen Zeitpunkte zur Bestimmung möglicher phototoxischer Effekte wurden so gewählt, dass sie möglichst mit den zeitlichen Endpunkten des Mikrokern-Assays und des HPRT-Assays übereinstimmen. Eine Bestimmung der Phototoxizität über 16 d, um die Dauer des HPRT-Assays zu berücksichtigen, war allerdings nicht im 24-Well-Format durchführbar. Bei einer Gesamtdauer des Assays von 16 Tagen und der kurzen Verdopplungszeit (12-16 h) der V79-Zellen würden sich selbst kleine Fehler bei der Zellaussaat exponentiell bemerkbar machen. Verlangsamtes Zellwachstum oder sogar

Apoptose durch Kontaktinhibition würden weitere Fehlerquellen darstellen und eine Limitierung der Nachinkubationszeit nach der Bestrahlung erfordern. Daher konnte zur Bestimmung der während des HPRT-Assays auftretenden Phototoxizität nur die Cloning Efficiency als zuverlässige, aber nachträgliche Kontrolle herangezogen werden. Durch geeignete Wahl der Parameter sollten zytotoxische Konzentrationen vor Beginn des jeweiligen Versuchs ausgeschlossen werden.

6.2.1 Wahl des Testsystems

Die Abbildungen 6.2.1a-c zeigen die Ergebnisse aller drei Zytotoxizitätstests, sowohl der unbestrahlten als auch der mit 125 mJ/cm² UVA-Licht bestrahlten V79-Zellen, und zwar nach 20 h, 48 h und 72 h Nachinkubationszeit nach der Bestrahlung. Zusätzlich zu den in den Diagrammen aufgeführten Negativkontrollen, reines Medium und DMSO (0,5% im Medium, Lösemittelkontrolle), und der Positivkontrolle Saponin (0,1% im Medium) wurden separat die Fluoreszenz- / Emissions-Werte der unbehandelten Zellen direkt vor Inkubationsbeginn bestimmt und zur besseren Vergleichbarkeit ebenfalls in Relation zur Mediumkontrolle gesetzt, um auf mögliche, im Vorfeld vermutete zytostatische Effekte schließen zu können. Diese liegen, je nach verwendetem Assay, bei etwa 45% (20 h), 10% (48 h) bzw. 3% (72 h) der Mediumkontrolle. Bei diesen Werten ist jedoch zu beachten, dass es sich nicht um eine reale Verminderung der Vitalität vor Inkubationsbeginn handelt; dieser Eindruck entsteht vielmehr dadurch, dass vor Inkubationsbeginn eine geringere Zellzahl in den Wells vorhanden ist als nach dem Ende des Assays, da die Zellen während der Versuchsdauer weiter proliferieren konnten und so mehr Zellen am Versuchsende zur Erzeugung fluorimetrischer / colorimetrischer Signale zur Verfügung standen.

Zur Bestimmung eines geeigneten Zytotoxizitätsassays und einer geeigneten Nachinkubationszeit wurden vorerst 125 mJ/cm² UVA-Licht als Strahlungsdosis gewählt; auf deren Eignung wird im Folgenden eingegangen (vgl. 6.2.3).

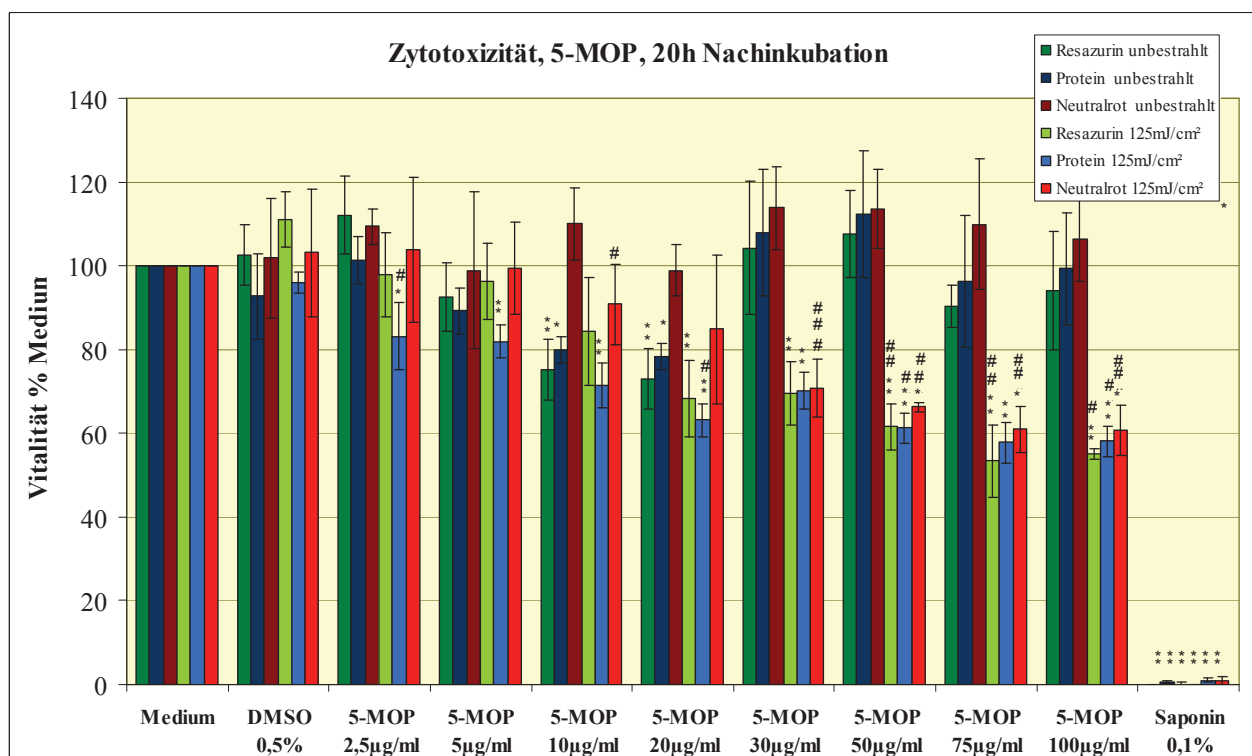


Abb. 6.2.1a: Zytotoxische Effekte von 5-MOP, sowohl unbestrahlt als auch bestrahlt mit 125 mJ/cm² UVA-Licht, gemessen im Resazurin-Reduktionstest, BCA-Assay und Neutralrot-Aufnahme-Test, 20 h nach der Substanzbehandlung / Bestrahlung (n=3; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01, ### ≤ 0,001)

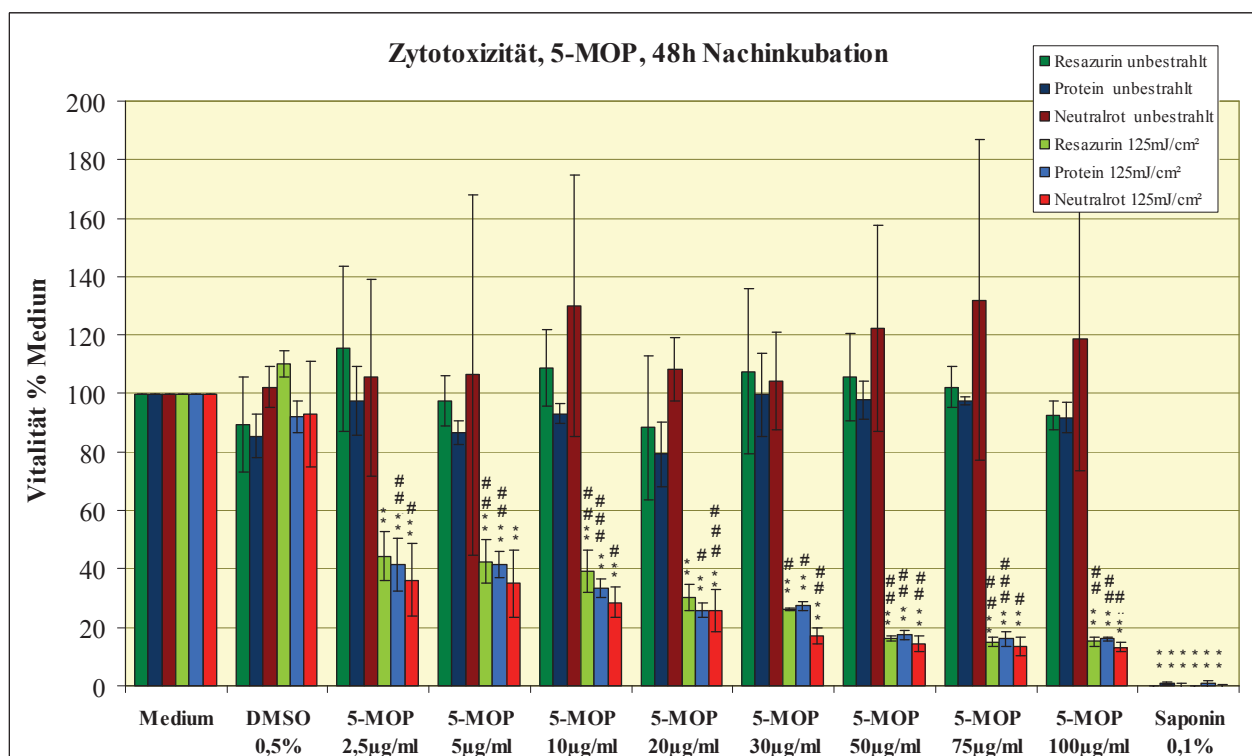


Abb. 6.2.1b: Zytotoxische Effekte von 5-MOP, sowohl unbestrahlt als auch bestrahlt mit 125 mJ/cm² UVA-Licht, gemessen im Resazurin-Reduktionstest, BCA-Assay und Neutralrot-Aufnahme-Test, 48 h nach der Substanzbehandlung / Bestrahlung (n=3; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01, ### ≤ 0,001)

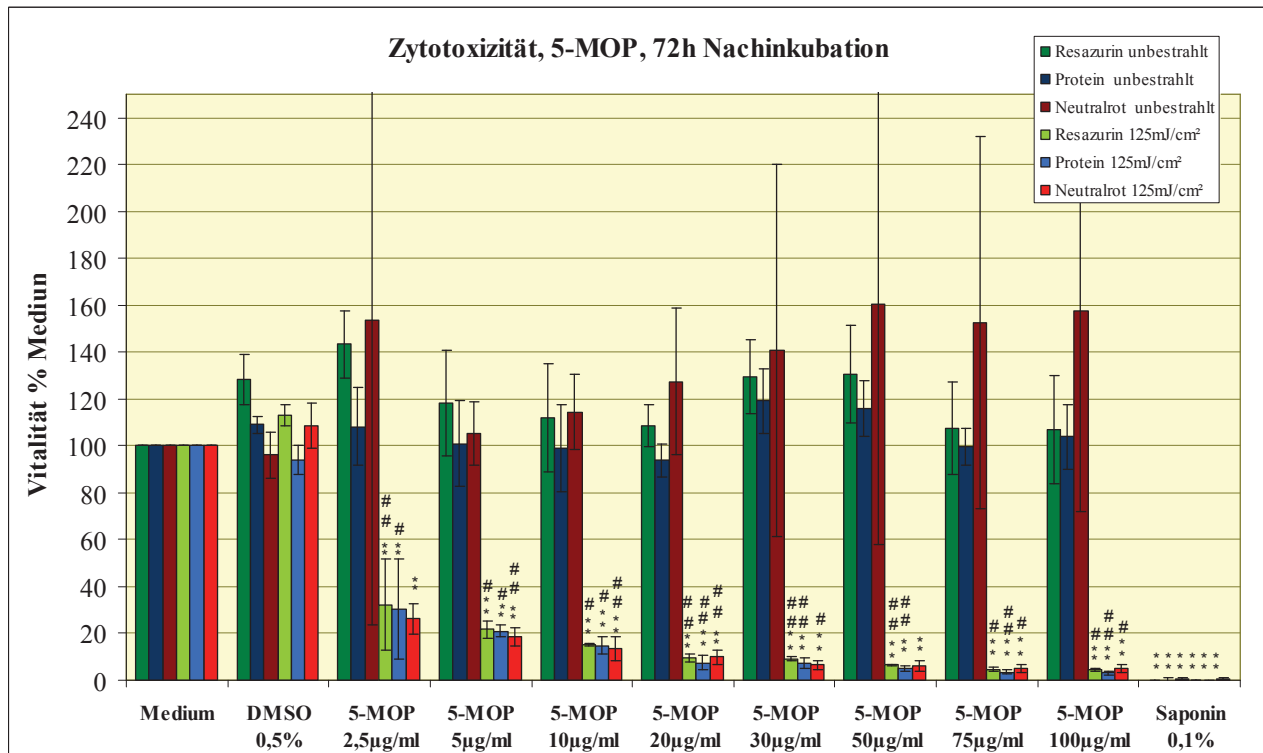


Abb. 6.2.1c: Zytotoxische Effekte von 5-MOP, sowohl unbestrahlt als auch bestrahlt mit 125 mJ/cm² UVA-Licht, gemessen im Resazurin-Reduktionstest, BCA-Assay und Neutralrot-Aufnahme-Test, 72 h nach der Substanzbehandlung / Bestrahlung (n=3; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnett's post test*, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01)

Die Abbildungen 6.2.1a-c zeigen bei allen drei verwendeten Zytotoxizitätsassays vergleichbare Ergebnisse. Allerdings ist die Zuverlässigkeit der Ergebnisse des Neutralrot-Aufnahmetests durch die hohen Standardabweichungen der Werte nach 48 h und 72 h beeinträchtigt: Die Inkubation mit allen verwendeten 5-MOP-Konzentrationen hat erwartungsgemäß bei allen drei Zeitpunkten ohne Bestrahlung keinen Einfluss auf die Vitalität der Fibroblasten im Vergleich zur Mediumkontrolle, nach der Bestrahlung zeigt sich allerdings eine konzentrations- und nachinkubationszeitabhängige Abnahme der Vitalität.

Bei allen drei Zeitpunkten zeigt sich ab einer 5-MOP-Konzentration von 50 µg/ml der bestrahlten Proben kein weiterer Abfall der Vitalität, sondern diese stagniert bei ca. 55% (20 h), 15% (48 h) bzw. 5% (72 h) und liegt damit nur etwa 1,5-fach über den Werten, die vor Beginn der Inkubation gemessen wurden, während die Werte der Lösemittelkontrollen einen Anstieg auf das 2,5-fache (20 h), 10-fache (48 h) bzw. 25-fache (72 h) aufweisen. Dahingegen ist die Vitalität der mit dem Detergens Saponin inkubierten Zellen auf 0% gefallen.

Im Resazurin-Reduktionstest und dem BCA-Assay ist nach 20 h erst ab einer Konzentration von 20 µg/ml ein signifikanter Abfall der Vitalität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu sehen. Nach 48 h und 72 h ist ein signifikanter Abfall in allen drei Testsystemen bereits ab einer Konzentration von 2,5 µg/ml zu erkennen. Vergleicht man die bestrahlten mit den unbestrahlten Proben, treten signifikante Unterschiede erst bei höheren 5-MOP-Konzentrationen auf, was allerdings auf Standardabweichungen des Vergleichswerts zurückzuführen ist.

Damit werden folgende Schlussfolgerungen für das am besten zur Bestimmung der Phototoxizität geeignete Testsystem gezogen: Innerhalb einer gewissen Schwankungsbreite konnten mit allen drei Zytotoxizitätsassays bei allen drei Zeitpunkten vergleichbare Ergebnisse gemessen werden (Abb. 6.2.1 a-c). Das bedeutet, die lysosomale Aktivität und Integrität, die mitochondriale Aktivität und der Proteingehalt bzw. die Proliferationsrate scheinen gleichermaßen von 5-MOP in Kombination mit UVA-Licht und der Nachinkubationszeit beeinflusst zu werden. Problematisch bei der Interpretation der Daten sind allerdings die mit der Nachinkubationszeit größer werdenden Standardabweichungen der unbestrahlten Proben im Neutralrot-Test. Dieses Problem konnte in Vorversuchen nicht eliminiert werden, da Neutralrot sowohl zeit- und temperaturabhängig als auch in Gegenwart der Zellen zur Auskristallisation im Inkubationsmedium und an der Zelloberfläche neigt. Da in diesem Test das in den Lysosomen verbleibende Neutralrot colorimetrisch detektiert wird, können eventuell im Well verbleibende Neutralrot-Kristalle das Ergebnis stark verfälschen. Zudem können die verwendeten Zellen nicht für eventuelle weitere Versuche verwendet werden, weshalb im Verlauf dieser Arbeit auf die Verwendung des Neutralrot-Aufnahmetests für die Bestimmung der Phototoxizität verzichtet wurde.

Da weiterhin der Resazurin-Reduktionstest und der BCA-Assay sowohl für bestrahlte als auch unbestrahlte Proben vergleichbare Ergebnisse mit vergleichbaren Standardabweichungen liefern, wurde auch auf die Proteinbestimmung verzichtet, da sie sowohl zeit- und arbeitsaufwändiger als auch kostengünstiger ist.

Aufgrund der vergleichbaren Werte im BCA-Assay und im Resazurin-Reduktionstest kann weiterhin geschlossen werden, dass die Verminderung der Resazurin-Reduktion der einzelnen Inkubationspunkte nicht auf eine verringerte mitochondriale Aktivität der einzelnen Zellen zurückzuführen ist, sondern auf eine Verringerung der Proliferation, womit generell weniger Zellen zur Resazurin-Reduktion zur Verfügung stehen.

6.2.2 Wahl der geeigneten Nachinkubationszeit / Charakterisierung phototoxischer Effekte

Hier soll auf die 5-MOP-vermittelten Schäden in Kombination mit UVA-Licht in Hinblick auf den geeigneten Zeitpunkt zur Bestimmung phototoxischer Effekte näher eingegangen werden. Dazu werden die gemessenen Werte im Resazurin-Reduktionstest mit den zeitabhängigen morphologischen Veränderungen und der analog zur Mikrokernrate über DAPI-Staining bestimmten Apoptoseinduktion verglichen.

Da die Konzentration von 2,5 µg/ml 5-MOP sich als geringste eingesetzte Konzentration für die Messungen nach 48 h & 72 h als zu hoch dosiert herausstellte, wurden die Versuche für diese Zeitpunkte mit geringeren Konzentrationen wiederholt. Abb. 6.2.2a zeigt die Ergebnisse des Resazurin-Reduktionstests von 5-MOP, unbestrahlt und in Kombination mit 125 mJ/cm² UVA-Licht, 20 h, 48 h und 72 h nach der Inkubation / Bestrahlung:

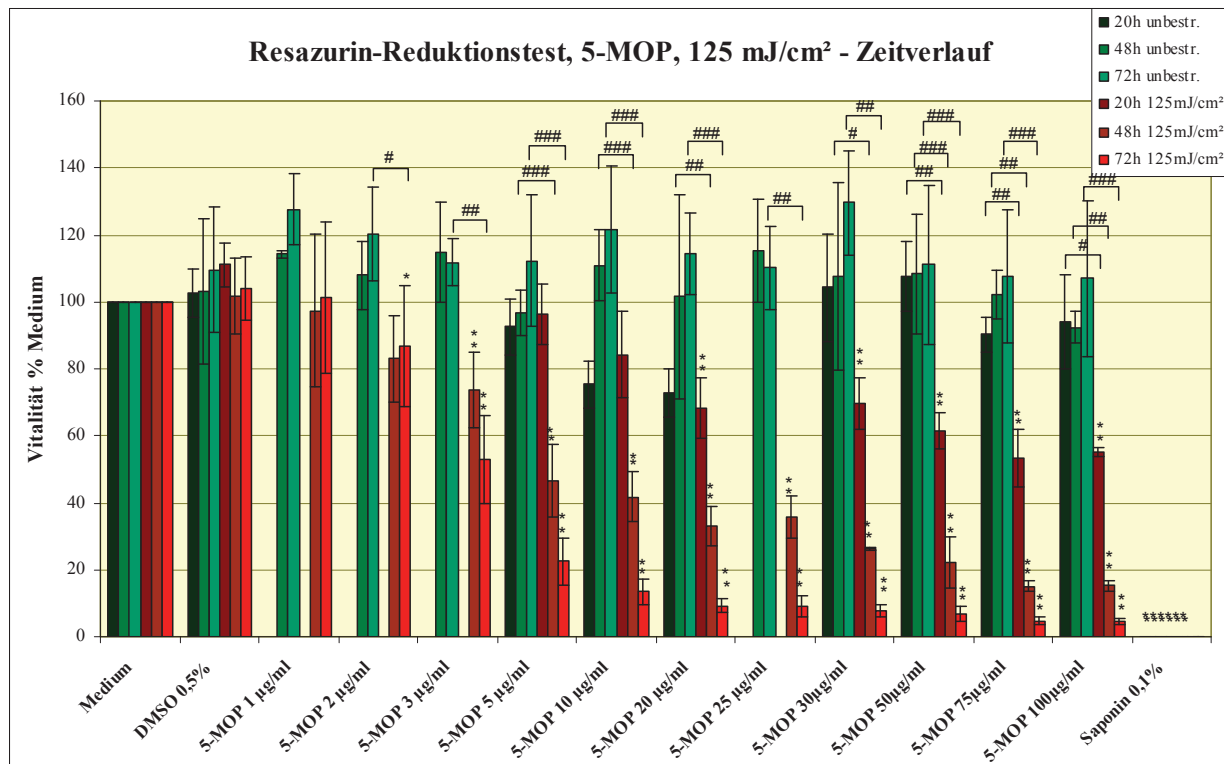


Abb. 6.2.2a: Zytotoxische Effekte von 5-MOP, sowohl unbestrahlt als auch bestrahlt mit 125 mJ/cm² UVA-Licht, gemessen im Resazurin-Reduktionstest, 20 h, 48 h & 72 h nach der Substanzbehandlung / Bestrahlung (n=3-5; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01, ### ≤ 0,001)

In Abb. 6.2.2a ist analog zu Abb. 6.2.1a-c zu erkennen, dass die Inkubation mit 5-MOP ohne anschließende Bestrahlung bei allen drei Zeitpunkten keinen Einfluss auf die Vitalität der behandelten Zellen hat. In Kombination mit 125 mJ/cm² UVA-Licht zeigt sich jedoch ein deutlicher, nachinkubationszeit- und konzentrationsabhängiger Einfluss von 5-MOP auf die Umsetzung von Resazurin zu Resorufin: Nach 20 h findet man eine sehr signifikante Abnahme der Vitalität der mit 20 µg/ml 5-MOP inkubierten Probe gegenüber der Mediumkontrolle, nach 48 h ist diese bereits bei 3 µg/ml 5-MOP zu erkennen und nach 72 h ist schon bei 2 µg/ml 5-MOP ein signifikanter Unterschied zu sehen. Auch hier ist das Auftreten signifikanter Unterschiede zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Proben erst bei höheren Konzentrationen durch die relativ hohen Standardabweichungen der unbestrahlten Proben und der unterschiedlichen Signifikanz-Tests zu erklären. Ebenfalls zu erkennen ist, dass sich die Werte bei allen drei Zeitpunkten bei den Konzentrationen von 75 und 100 µg/ml 5-MOP einem festen Wert von 55% (20 h), 15% (48 h) bzw. 4,5% (72 h) in der Größenordnung der Werte vor der Inkubation asymptotisch annähern und somit wiederum über der Vitalität der Positivkontrolle (0%) liegen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Phototoxizität nach verschiedenen Nachinkubationszeiten wurden die zugehörigen EC₅₀-Werte berechnet und in Tab. 6.2.2, sowohl in der Einheit µg/ml Inkubationsmedium als auch µM, zusammengefasst:

Tab. 6.2.2a: Nachinkubationszeitabhängige EC_{50} -Werte von 5-MOP, bestrahlt mit 125 mJ/cm^2

Zeitpunkt nach Bestrahlung	$EC_{50} / \mu\text{g/ml}$	$EC_{50, \mu\text{M}} / \mu\text{mol}$
20 h	$99,1 \pm 17,0$	$458,4 \pm 78,7$
48 h	$8,4 \pm 1,1$	$38,8 \pm 5,2$
72 h	$3,3 \pm 0,2$	$15,5 \pm 1,1$

In Abb. 6.2.2b sind lichtmikroskopische Aufnahmen von V79-Zellen zu sehen, die mit $10 \mu\text{g/ml}$ 5-MOP inkubiert und mit 125 mJ/cm^2 UVA-Licht bestrahlt wurden, aufgenommen 0-72 h nach der Behandlung:

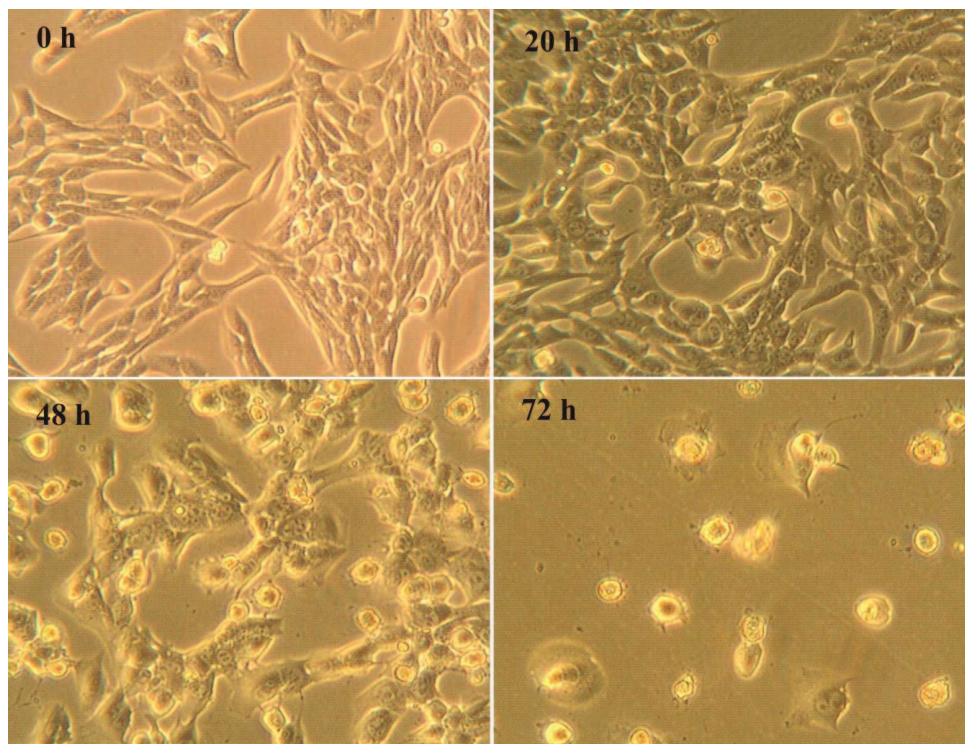


Abb. 6.2.2b: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen morphologischer Veränderungen von V79-Zellen, inkubiert mit $10 \mu\text{g/ml}$ 5-MOP und bestrahlt mit 125 mJ/cm^2 UVA-Licht, photographiert 0-72 h nach der Bestrahlung; Vergrößerung des Mikroskops: 10×40

Direkt nach der Bestrahlung ist das Erscheinungsbild der Zellen unverändert, nach 20 h sind minimale Unterschiede zu erkennen, die allerdings erst nach 48 h deutlich werden: Es zeigen sich die für apoptotische Fibroblasten typischen Filopodien, also stachelartige Auswüchse, und ein vermehrtes Auftreten kleiner, kugelförmig geschrumpfter Zellen, die nach 72 h vorherrschend sind. Da DNA-Adduktbildungen von FCs in Kombination von UVA-Strahlung die Hauptursache zytotoxischer Effekte *in vitro* sind, muss daher in diesem Zusammenhang der Begriff „zytotoxisch“ auf „zunächst zytostatisch“ präzisiert werden (vgl. 2.4.2.1) (Ben-Hur and Elkind 1973, Musajo and Rodighiero 1972, Bethea et al. 1999). Weiterhin sind sowohl Zellzyklusarrest als auch Apoptose mögliche, p53-vermittelte Antworten auf DNA-Schäden, weshalb zur Vervollständigung des Bildes in einem letzten Schritt die zeitabhängige Apoptoseinduktion bestimmt wurde (vgl. 2.4.2.1) (Elledge 1996, Godar 1999, Gervais, Seth and Zhang 1998, Lowndes and Murguia 2000, Sheehan and Young 2002):

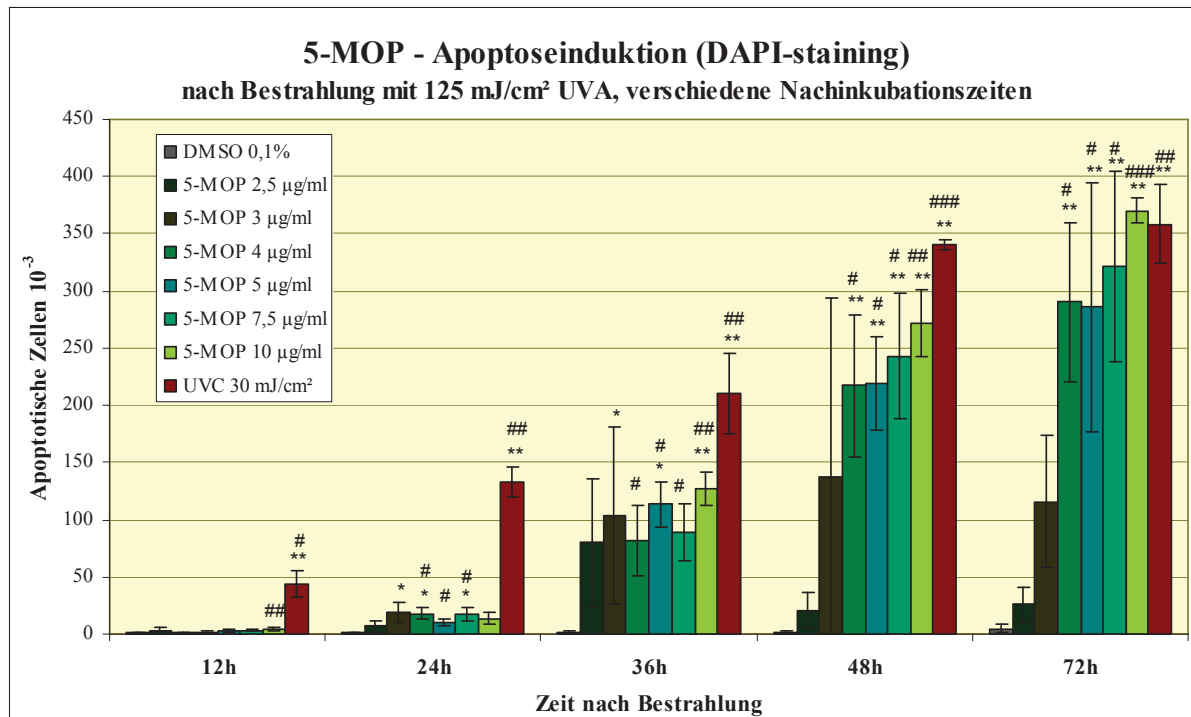


Abb. 6.2.2c: Auftreten apoptotischer Zellen in Abhängigkeit der 5-MOP-Konzentration und Nachinkubationszeit nach Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht; Apoptosen (10⁻³) vor Beginn der Inkubation/Bestrahlung: $0,83 \pm 0,24$ (n=3; p-value: DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA*+*Dunnnett's post test*, * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$; vor vs. nach Behandlung: *two-tailed student's t-test*, *Welch corrected*, # $\leq 0,05$, ## $\leq 0,01$, ### $\leq 0,001$)

Abb. 6.2.2c zeigt die mittels DAPI-staining analog zur Zahl mikrokerntragender Zellen bestimmte Apoptoseinduktion in V79-Zellen durch verschiedene Konzentrationen von 5-MOP in Kombination mit 125 mJ/cm² in Abhängigkeit von der Nachinkubationszeit. Als Positivkontrolle wurde UVC-Strahlung der Dosis 30 mJ/cm² verwendet, die Anzahl apoptotischer Zellen wurde vor Beginn der Behandlung auf $0,83 \pm 0,24 \cdot 10^{-3}$ bestimmt. Während bei der UVC-Bestrahlung bereits nach 12 h ein sehr signifikanter Anstieg der apoptotischen Zellen auf $44 \pm 11 \cdot 10^{-3}$ zeigt, die sich linear zeitabhängig auf etwa $350 \cdot 10^{-3}$ (48 h und 72 h) erhöht, sind bei 5-MOP plus UVA-Bestrahlung außer bei 10 µg/ml signifikante Unterschiede erst nach 24 h erkennbar. Innerhalb der Standardabweichungen ist außer bei 2,5 µg/ml und 3 µg/ml nach 48 und 72 h kein oder nur ein minimaler, konzentrationsabhängiger Anstieg der apoptotischen Zellen zu verzeichnen. Für die Konzentrationen 4-10 µg/ml kann ein etwa linearer, zeitabhängiger Anstieg von ca. $15 \cdot 10^{-3}$ auf $300 \cdot 10^{-3}$ beobachtet werden, wohingegen für 2,5 µg/ml und 3 µg/ml die Apoptose-Induktion glockenförmig verläuft mit einem Maximum bei 36 h (2,5 µg/ml) bzw. 48 h (3 µg/ml). Abb. 6.2.2d zeigt die zugehörigen morphologischen Veränderungen. Analoge Ergebnisse wurden auch von Viola et al. (2009) durchflusscytometrisch an humanen Keratinozyten mit 5 µM Angelicin und 8-MOP und einer UVA-Dosis von 2,5 J/cm² beobachtet: Nach 24 h, 48 h und 72 h befanden sich 10 % bzw. 6 %, 85 % und 90 % der Zellen in dem der apoptotischen Zellpopulation zugeordneten sub-G₁-Peak (Viola et al. 2009).

Mein Ergebnis lässt folgende Schlussfolgerungen zu: Bis etwa 3 µg/ml 5-MOP in Kombination mit 125 mJ/cm² UVA-Strahlung scheinen die entstandenen Schäden während des aufgrund von Literaturvergleichen vermuteten induzierten Zellzyklus-Arrests weitgehend reparabel zu sein, während Konzentrationen darüber aufgrund überlasteter

Reparatursysteme in V79-Zellen zu stark toxisch wirken (vgl. 2.4.2). Zudem scheinen die beobachteten Effekte von 5-MOP wirklich rein DNA-Schadens-induzierter und p53-vermittelter Natur zu sein und ausschließlich in verspäteter Apoptose zu resultieren, da die UVC-induzierten Apoptosen schon früher auftreten. Der Literatur zufolge werden diese nicht nur über DNA-Schäden und p53 induziert. UVC-Strahlung kann auch direkt die Todesrezeptoren wie den Fas-Rezeptor schädigen, was in einer mittelfrühen Apoptose resultiert. Somit ist diese, genau wie eine frühe Apoptose über direkte mitochondriale Schäden, für 5-MOP auszuschließen (Godar 1999, Sheehan and Young 2002).

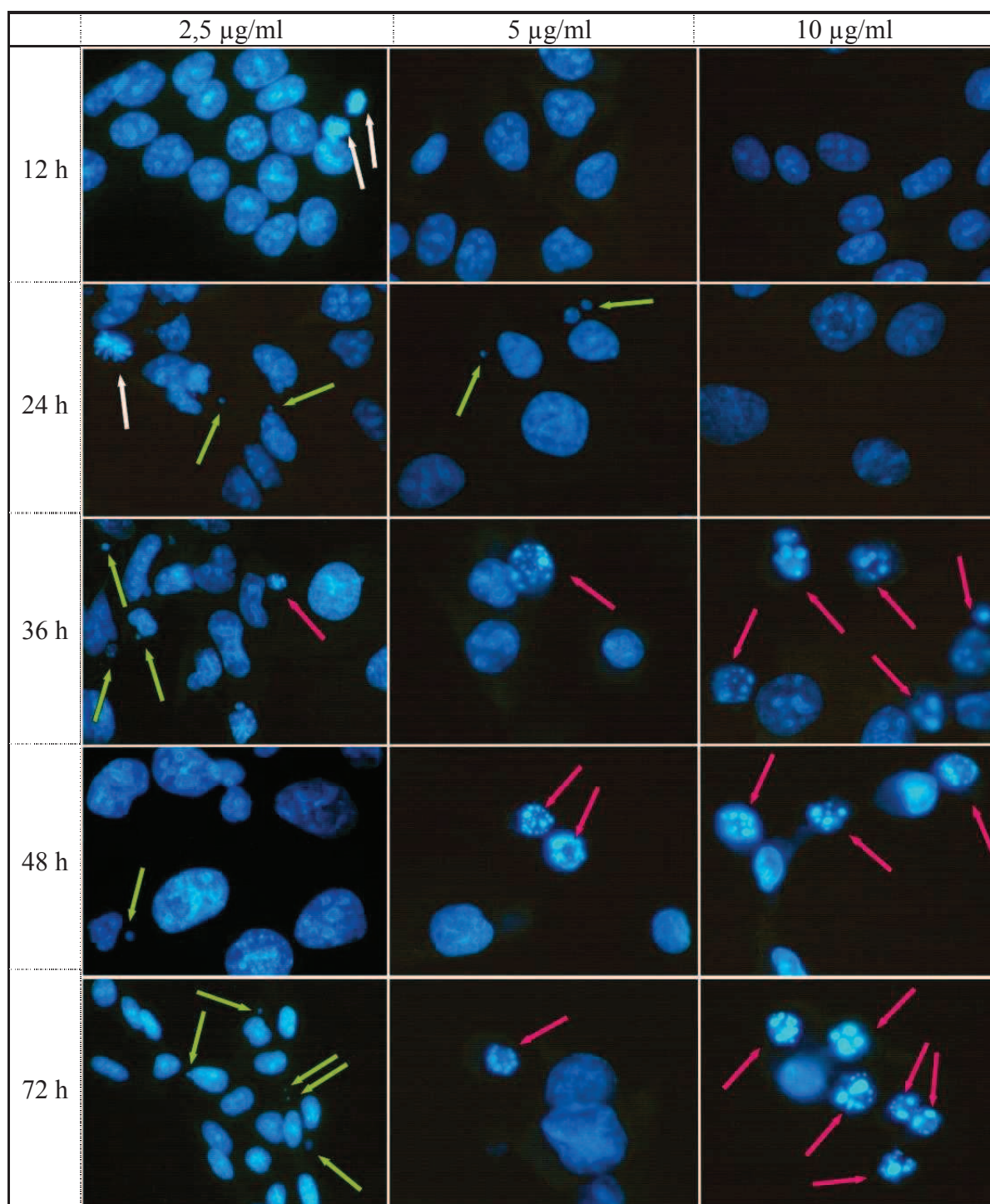


Abb. 6.2.2d: Nachinkubationszeit- und 5-MOP-konzentrationsabhängiges Auftreten von Apoptosen nach der Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht in V79-Zellen, DAPI-staining, repräsentative Abbildungen; es bedeuten die Farben der Pfeile: magenta=apoptotische Zelle, grün=Mikrokern, weiß=mitotische Zelle

Abb. 6.2.2d zeigt die morphologischen Veränderungen der mit DAPI gefärbten Zellkerne der mit 2,5, 5 und 10 µg/ml 5-MOP inkubierten und mit 125 mJ/cm² bestrahlten V79-Zellen in Abhängigkeit von der Nachinkubationszeit. Bei den Inkubationen mit 2,5 µg/ml 5-MOP sind kaum apoptotische Zellkerne (magentafarbene Pfeile) zu erkennen, jedoch ein stark erhöhtes Auftreten von Mikrokernen (grüne Pfeile) ab 24 h Nachinkubation im Vergleich zu 12 h und vereinzelte mitotische Zellen (weiße Pfeile). Bei 5 µg/ml 5-MOP sind nach 24 h vereinzelt Mikrokern zu sehen, die bei 10 µg/ml völlig ausbleiben. Nach 36 h ist bei den beiden höheren Konzentrationen ein erhöhtes Auftreten von Apoptosen (ca. 10%) zu verzeichnen, deutlich zu erkennen an den typischen Bläschen aus kondensiertem Chromatin einheitlicher Struktur. Diese treten zeitabhängig verstärkter auf, bis ein Anteil von ca. 30% (72 h) apoptotischer Zellen erreicht ist.

Das verstärkte Auftreten von Mikrokernen und vereinzelt mitotischen Zellen nach 24 h bei 2,5 µg/ml 5-MOP sind ein Zeichen dafür, dass bei dieser Konzentration noch eine Proliferation möglich ist, da sich DNA-Schäden erst nach der Zellteilung als Mikrokern manifestieren können. Dies ist bei 5 µg/ml kaum, bei 10 µg/ml gar nicht mehr der Fall; bei diesen Konzentrationen ist Apoptose mit vermutlich vorausgehendem Zellzyklusarrest der vorherrschende Effekt.

Vergleicht man die die EC₅₀-Werte der mit 5-MOP inkubierten und mit 125 mJ/cm² UVA-Licht bestrahlten V79-Zellen verschiedener Nachinkubationszeiten mit den morphologischen Veränderungen und der Induktion von Apoptosen, scheint der EC₅₀-Wert von $3,34 \pm 0,24$ µg/ml nach 72 h einer realistischen Beschreibung der Phototoxizität von 5-MOP am nächsten zu kommen, da eine Bestimmung nach 96 h aufgrund der o.g. Fehlerquellen nicht sinnvoll ist. Da über den Resazurin-Reduktionstest auch die im Mikrokerntest und HPRT-Assay höchste einzusetzende Konzentration bestimmt werden soll, wird hier ein Vergleich mit den Anforderungen gezogen: Bei beiden muss die Proliferation gewährleistet sein, da Mikrokern erst nach einer durchlaufenen Mitose entstehen können und Mutationen vererbare Modifikationen der DNA sind. Die minimale geforderte Vitalität ist im Mikrokern-Test $55 \pm 5\%$, beim HPRT-Assay sollte die Cloning Efficiency oder das relative totale Wachstum bei wenigstens 10-20% liegen (Glatt 1993, OECD 2010, OECD 1997). Vorausgreifend sollte erwähnt werden, dass sich im Mikrokerntest ab 2 µg/ml 5-MOP eine Abnahme in der zuvor gestiegenen Mikrokernrate bemerkbar macht, was auf einen Rückgang der Proliferation zurückzuführen ist, und die Mutationsfrequenz im HPRT-Assay ab 3 µg/ml negativ beeinflusst wird, wobei die CE bei etwa 75% liegt.

Daher wird im Folgenden der Resazurin-Reduktionstest nach 72 h Nachinkubationszeit durchgeführt und Konzentrationen, die einen Abfall der Vitalität auf unter 55% verursachen, werden im Mikrokerntest und HPRT-Genmutationstest nicht mehr eingesetzt.

6.2.3 Wahl der geeigneten Strahlungsdosis

Neben einigen Versuchen, die klar die UVA-Strahlungsdosis-Abhängigkeit untersuchen sollen, werden zur besseren Vergleichbarkeit die Versuche zu den phototoxischen, mutagenen und clastogenen Effekten mit einer einheitlichen Strahlungsdosis durchgeführt. Diese soll ausreichen, bei den weniger potenten Furocumarinen wie Angelicin noch konzentrationsabhängige Dosis-Wirkungsbeziehungen erstellen zu können, darf aber bei den potenteren FCs wie 5-MOP nicht zu übermäßig starken phototoxischen Effekten führen. Daher wird der Resazurin-Reduktionstest sowohl bei 5-MOP (Abb. 6.2.3a) als

auch Angelicin (Abb. 6.2.3d) mit UVA-Strahlungsdosen von 50-200 mJ/cm² durchgeführt, nach 72 h gemessen und mit den jeweils unbestrahlten Proben verglichen.

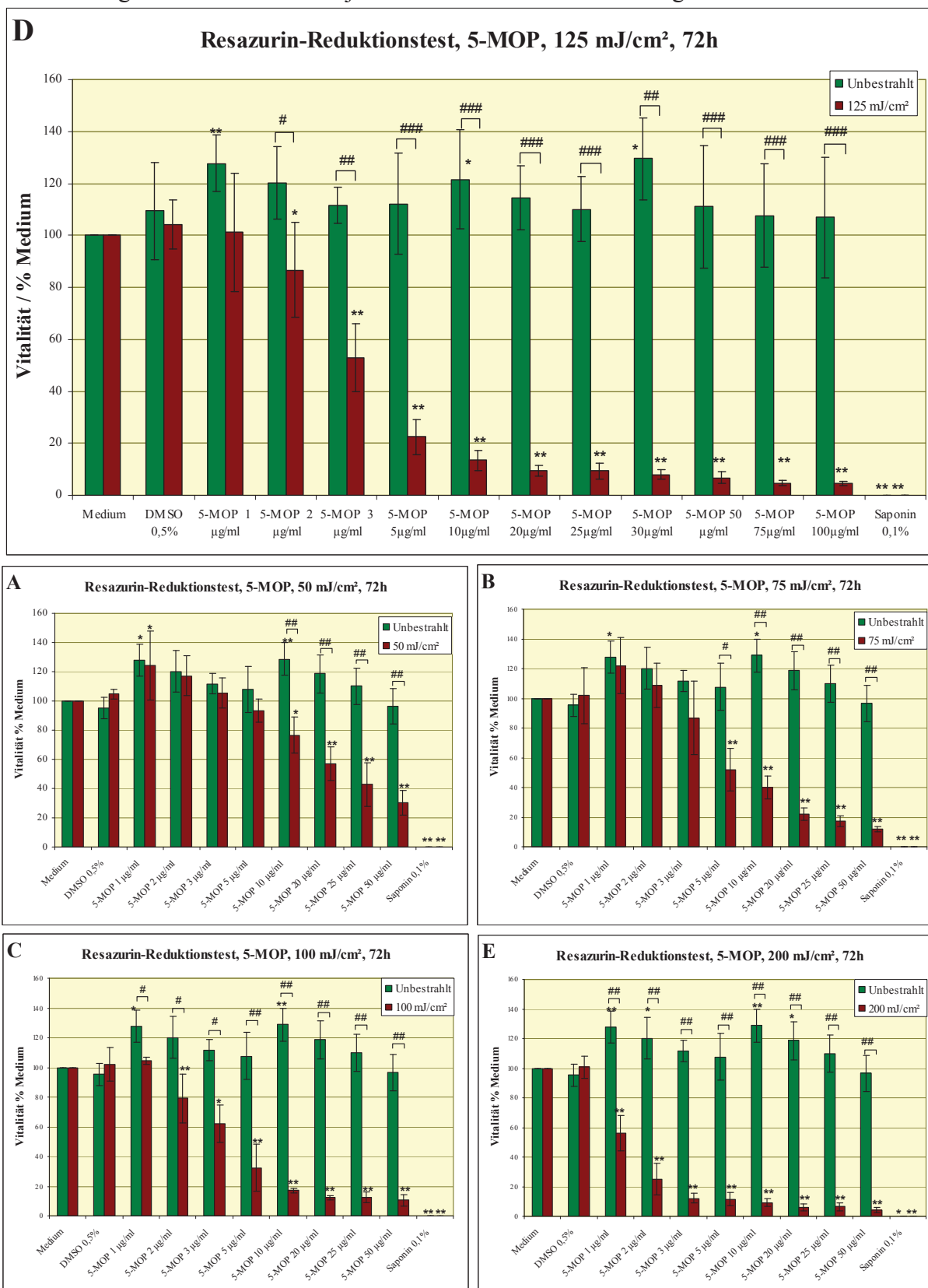


Abb. 6.2.3a A-E: Resazurin-Reduktionstest zur Erfassung phototoxischer Effekte von 5-MOP. Dargestellt sind die Effekte verschiedener UVA-Dosen (50 (A), 75 (B), 100 (C), 125 (D), 200 (E) mJ/cm²) auf mit variablen 5-MOP-Konzentrationen inkubierte V79-Zellen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, gemessen 72 h nach der Inkubation/Bestrahlung (n=4-9; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # $\leq 0,05$, ## $\leq 0,01$, ### $\leq 0,001$)

Zu erkennen ist eine sowohl 5-MOP-konzentrations- als auch UVA-dosisabhängige Vitalitätsabnahme, die aber in keinem Fall 0% erreicht. Während bei den unbestrahlten Proben bei keiner der verwendeten 5-MOP-Konzentrationen eine Abnahme der Vitalität beobachtet werden kann, ist ein sehr signifikanter Abfall der Resazurin-Reduktion bei einer Dosis von 50 mJ/cm² bei 20 µg/ml zu sehen; dieser kann mit steigender UVA-Strahlungsdosis bei immer geringeren 5-MOP-Konzentrationen beobachtet werden und tritt bei der höchsten Strahlungsdosis von 200 mJ/cm² sogar schon bei 1 µg/ml 5-MOP auf. Zu besseren Vergleichbarkeit der Phototoxizität sind die UVA-dosisabhängigen EC₅₀-Werte der Resazurin-Reduktion von 5-Methoxypsoralen nach 72 h in Tab. 6.2.3a tabellarisch aufgeführt:

Tab. 6.2.3a: UVA-Strahlungsdosisabhängige EC₅₀-Werte von 5-MOP, 72 h Nachinkubation

UVA-Strahlungsdosis	EC ₅₀ / µg/ml	EC _{50,µM} / µmol
0 mJ/cm ²	n.d.	n.d.
50 mJ/cm ²	23,7 ± 4,3	109,5 ± 19,7
75 mJ/cm ²	7,3 ± 0,9	33,8 ± 4,1
100 mJ/cm ²	4,0 ± 0,4	18,4 ± 1,9
125 mJ/cm ²	3,3 ± 0,2	15,5 ± 1,1
200 mJ/cm ²	1,1 ± 0,1	5,1 ± 0,5

In Abb. 6.2.3b ist die logarithmierte Vitalität (% Medium) in Abhängigkeit der UVA-Dosis aufgetragen. Exemplarisch wird der Verlauf der fixen 5-MOP-Konzentrationen 0, 2, 5 und 50 µg/ml gezeigt. Diese Auftragung erfolgte analog zu Babudri et al. (1981), die die Menge an DNA-gebundenem 8-MOP durch zwei unterschiedliche Bestrahlungsdauern von V79-Zellen in Gegenwart einer Lösung mit 5 µg/ml 8-MOP fixiert haben und nach dem Ablösen des ungebundenen 8-MOP weiter bestrahlt haben:

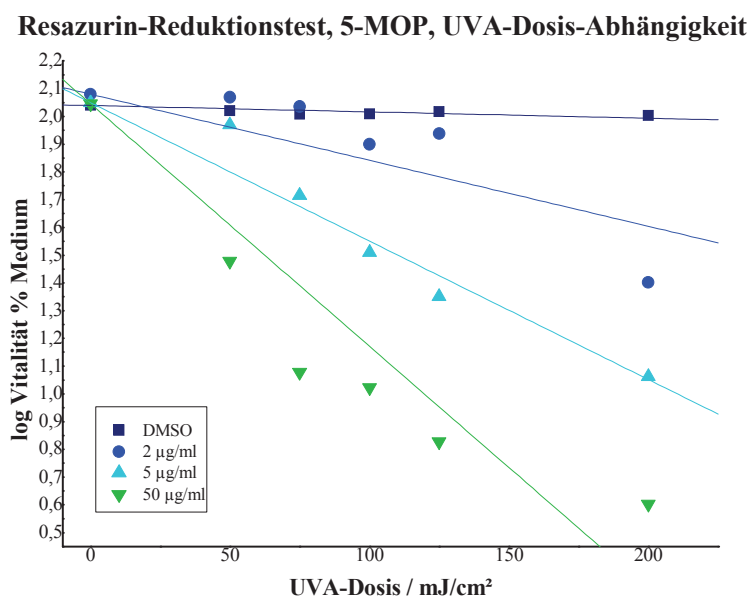


Abb. 6.2.3b: Resazurin-Reduktions-Test von fixen Konzentrationen (0, 2, 5, 50 µg/ml) 5-MOP. Gezeigt ist die Abnahme der Vitalität (log % Medium) in Abhängigkeit von der applizierten UVA-Dosis (0-200 mJ/cm²)

In Abb. 6.2.3b kann eine nahezu lineare Abnahme der Vitalität (log) nach Überschreiten eines vernachlässigbaren Schwellenwertes in Abhängigkeit der UVA-Dosis beobachtet werden, und zwar bei allen 5-MOP-Konzentrationen, die sich allein in der Steilheit der Geraden unterscheiden. Analoge Beobachtungen wurden auch von anderen Autoren an verschiedenen Zellen und Organismen gemacht, wie Laquerbe et al. (1995) (Trimethylpsoralen, AHH-1-Zellen), Babudri et al. (1981) (8-MOP, V79-Zellen), Schimmer (1981) (5-MOP & 8-MOP, *Chlamydomonas reinhardtii*) und Ashwood-Smith et al. (1977 bzw. 1980) (Psoralen bzw. 5-MOP, CHA-Zellen bzw. *E.coli* und CHO-Zellen).

In einem weiteren Schritt sollen noch die EC_{50} -Werte der UVA-Dosen, die somit als variable Konzentrationen einer Testsubstanz behandelt werden, bei jeweils fixen 5-MOP-Konzentrationen bestimmt werden. In Tab. 6.2.3b werden sie aufgelistet:

Tab. 6.2.3b: EC_{50} -Werte der UVA-Dosis bei versch. 5-MOP-Konzentrationen

5-MOP / $\mu\text{g/ml}$	EC_{50} -Wert UVA-Dosis / mJ/cm^2
1	$186,4 \pm 7,9$
2	$164,5 \pm 19,7$
3	$112,5 \pm 5,1$
5	$82,4 \pm 5,6$
10	$67,9 \pm 6,5$
20	$53,4 \pm 4,6$
25	$42,8 \pm 5,5$
50	$32,1 \pm 8,5$

In Tab. 6.2.3b ist, wie erwartet und analog zu Tab. 6.2.3a, ein klarer reziproker Zusammenhang zwischen der 5-MOP-Konzentration und der UVA-Dosis zu erkennen. Wie dieser genau verläuft, soll in Abbildung 6.2.3c verdeutlicht werden:

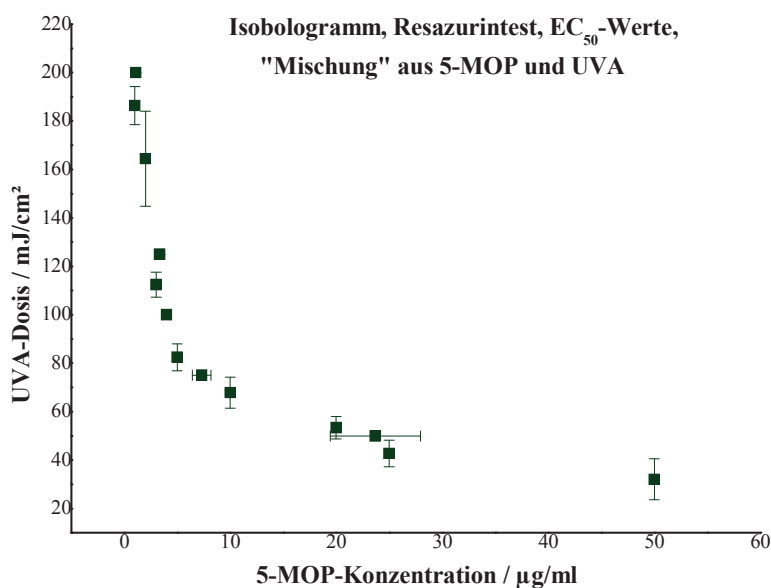


Abb. 6.2.3c: Isobolographische Darstellung der EC_{50} -Werte, sowohl der 5-MOP-Konzentration als auch der UVA-Dosis, aus dem Resazurin-Reduktionstest als zu betrachtender Effekt mit der UVA-Dosis als Funktion der 5-MOP-Konzentration

Da weder für UVA-Licht als auch für 5-MOP als Einzelgabe ein Effekt verzeichnet bzw. ein EC_{50} -Wert bestimmt werden konnte, kann zwar keine Ausgleichsgerade in das Diagramm eingezeichnet werden, jedoch ist klar zu erkennen, dass die isobolographische Auftragung nicht linear, sondern eindeutig konvex verläuft, was auf Synergismus schließen lässt (Marquardt and Schäfer 2004). Ein derartiger Verlauf stimmt zum einen sehr gut mit der Literatur überein: Yurkow und Laskin (1991) zeigten an der murinen Sarcoma-Zelllinie S-180 über den Vergleich der EC_{50} -Werte aus der Kombination variabler 8-MOP-, 5-MOP-, 5-MA- und TMP-Konzentrationen mit ebenfalls variablen UVA-Dosen eine synergistische Wirkung der „FC-UVA-Mischung“. Zum anderen war dieser Verlauf auch zu erwarten, da UVA-Licht zur photochemischen Aktivierung von Furocumarinen benötigt wird (Kitamura, Kohtani and Nakagaki 2005) und beide Komponenten alleine keine hier detektierbaren Wirkungen haben.

Analog zu Abb. 6.2.3a soll an einem i. A. weniger potenten Furocumarin, Angelicin, die Phototoxizität in Abhängigkeit der Substanz- und UVA-Dosis im Resazurin-Reduktionstest überprüft werden (Abb. 6.2.3d):

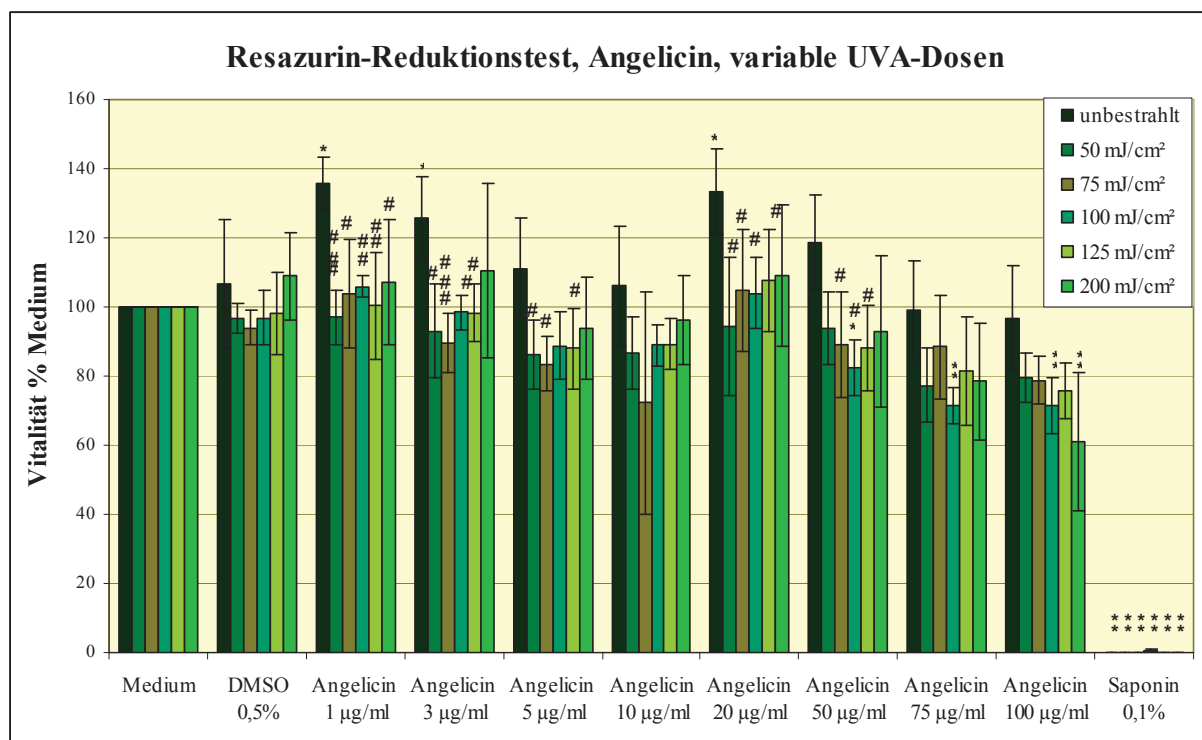


Abb. 6.2.3d: Resazurin-Reduktionstest zur Erfassung phototoxischer Effekte von Angelicin. Dargestellt sind die Effekte verschiedener UVA-Dosen (0-200 mJ/cm²) auf mit variablen Angelicin-Konzentrationen inkubierte V79-Zellen, gemessen 72h nach der Inkubation/Bestrahlung (n=4; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # $\leq 0,05$, ## $\leq 0,01$, ### $\leq 0,001$)

Ähnliche UVA-strahlungsdosis- und FC-konzentrationsabhängige Effekte wie in Abb. 6.2.3a sind auch bei dem monofunktionalen Angelicin zu beobachten, jedoch wird die Vitalität der behandelten Zellen bei Weitem nicht so stark gesenkt wie bei dem bifunktionalen 5-MOP. Eine sehr signifikante Verringerung der Vitalität im Vergleich zur Mediumkontrolle ist nur bei den höchsten eingesetzten Angelicin-Konzentrationen, 75 µg/ml (100 mJ/cm²) und 100 µg/ml (100 und 200 mJ/cm²), zu sehen; die vermehrt

auftretenden Signifikanzen im Vergleich zu den unbestrahlten Proben sind durch deren Schwankungen in Richtung höherer Vitalität zu erklären.

Generell zeigt Angelicin eine deutlich geringere DNA-Bindungsaffinität als z.B. methylsubstituierte angulare FCs wie 4,6,4'-Trimethylangelicin und ist weiterhin nicht in der Lage, DNA-Crosslinks auszubilden, die für die im Allgemeinen höhere Phototoxizität linearer Psoralene verantwortlich gemacht werden (Ben-Hur and Elkind 1973, Bordin, Dall'Acqua and Guiotto 1991, Scott, Pathak and Mohn 1976). Daher konnte nur der EC_{50} -Wert für Angelicin bei der höchsten UVA-Strahlungsdosis (200 mJ/cm^2) sinnvoll auf $114,2 \pm 14,4 \text{ } \mu\text{g/ml}$ bzw. $EC_{50,\mu\text{M}} = 613,4 \pm 77,3 \text{ } \mu\text{mol}$ angenähert werden, da der EC_{50} -Wert der Dosis 125 mJ/cm^2 mit $227,0 \pm 143,6 \text{ } \mu\text{g/ml}$ aufgrund der hohen Standardabweichung nicht verlässlich ist. Allerdings muss hier vorausgreifend erwähnt werden, dass für Angelicin das Erstellen von Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei einer UVA-Dosis von 125 mJ/cm^2 im HPRT-Assay und Mikrokerntest problemlos möglich ist, weshalb die für 5-MOP sehr hohe Dosis von 200 mJ/cm^2 nicht zwingend verwendet werden muss.

Ein weiterer limitierender Faktor ist die praktische Durchführung: Da die Zellen nur mit einem dünnen PBS⁻-Film ohne Deckel in einer nicht sterilisierbaren UV-Kammer bestrahlt werden, um die effektive UVA-Dosis genau bestimmen zu können und Verfälschungen durch Absorption oder Herauslösen der FCs aus den Zellen durch eine PBS⁻-Lösung zu vermeiden, ist die maximale Bestrahlungsdauer begrenzt, da ein Austrocknen der Zellen oder Kontaminationen drohen. Ohne Verzögerungen durch das Handling der Zellen beträgt die Bestrahlungsdauer für das Erreichen von 125 mJ/cm^2 ca. 40 s, für 200 mJ/cm^2 etwa 60 s, wobei diese Zeitspanne nicht überschritten werden sollte.

Papadopoulo und Averbeck (1985) fanden mit isolierter DNA aus V79-Zellen einen strikt linearen Zusammenhang zwischen der Bildung von 5-MOP- und 8-MOP-Monoaddukten und der applizierten UVA-Dosis (mittels einer mit der in dieser Arbeit verwendeten vergleichbaren Strahlungsquelle) bei fixen Konzentrationen. Zudem zeigten sie einen linearen Verlauf der UVA-dosisabhängigen Ausbildung von Interstrand-Crosslinks (ICL) in Übereinstimmung mit der vorangehenden Arbeit von Cohen et al. (1981): Diese fanden in E-1-Zellen aus normalen humanen Lymphozyten einen linearen Zusammenhang zwischen der 8-MOP-Konzentration ($0-1 \text{ } \mu\text{g/ml}$) und der Ausbildung von ICLs bei drei verschiedenen Strahlungsdosen ($300-1500 \text{ mJ/cm}^2$). Diese Angaben und die Erkenntnisse von Ben-Hur und Elkind (1973) oder Musajo und Rodighiero (1972), wonach die Phototoxizität von Psoralenen in V79-Zellen oder Bakterien von der Ausbildung von FC-Addukten und Crosslinks abhängig ist, befinden sich in Kongruenz mit den hier ermittelten Zusammenhängen zwischen Phototoxizität und UVA-Dosis.

Daher hat die Wahl der in dieser Arbeit verwendeten UVA-Standard-Dosis keinen Einfluss auf die Art der DNA-Schäden und das Verhältnis zwischen Monoaddukten und Crosslinks und kann daher rein aufgrund der benötigten Effektspanne und praktischer Handhabung getroffen werden, weshalb sie auf 125 mJ/cm^2 festgelegt wird.

6.3 Phototoxizität: Ergebnisse Resazurin-Reduktionstest

Nachdem unter 6.2 eine geeignete Methode etabliert wurde, ein breites Spektrum an Furocumarinen hinsichtlich ihrer Phototoxizität unter identischen Bedingungen (Bestrahlung mit 125 mJ/cm², 72 h Nachinkubationszeit) zu untersuchen, wurde diese auf verschiedene Furocumarine und ihre Mischungen angewandt. Dabei wurden die EC₅₀-Werte der einzelnen Furocumarine und Limettin bestimmt und ihre Mischungen hinsichtlich ihres additiven Verhaltens überprüft.

Exemplarisch wurden Resazurin-Reduktionstests an verschiedenen Furocumarinen mit unterschiedlichen Strahlungsdosen nach 48 h und 72 h durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Ergebnisse der Methodenwahl universell einsetzbar sind. Tab. 6.3a zeigt die EC₅₀-Werte ausgewählter Beispiele:

Tab. 6.3: EC₅₀-Werte versch. Furocumarine in Kombination mit teilweise verschiedenen UVA-Strahlungsdosen nach 48 h und 72 h zum Vergleich des Einflusses der Nachinkubationszeit

Furocumarin	UVA-Dosis / mJ/cm ²	EC ₅₀ / µg/ml (48 h)	EC _{50,µM} / µM (48 h)	EC ₅₀ / µg/ml (72 h)	EC _{50,µM} / µM (72 h)
5-MOP	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5-MOP	50	37,2 ± 6,6	171,9 ± 30,3	23,7 ± 4,3	109,5 ± 19,7
5-MOP	75	14,30 ± 2,4	66,1 ± 11,0	7,3 ± 0,9	33,8 ± 4,1
5-MOP	100	12,7 ± 3,0	58,9 ± 13,9	4,0 ± 0,4	18,4 ± 1,9
5-MOP	125	8,4 ± 1,1	38,8 ± 5,2	3,3 ± 0,2	15,5 ± 1,1
5-MOP	200	4,9 ± 0,8	22,8 ± 3,9	1,1 ± 0,1	5,1 ± 0,5
Angelicin	200	115,8 ± 20,1	622,3 ± 107,7	114,2 ± 14,4	613,4 ± 77,3
Imperatorin	125	125,9 ± 7,1	465,7 ± 26,3	21,7 ± 1,5	80,3 ± 5,5
Psoralen*	125	37,5 ± 2,8	201,3 ± 15,3	12,0 ± 0,7	64,5 ± 3,7

*Literaturdaten, berechnet aus (Lohr 2009, Lohr, Raquet and Schrenk 2010); n.d. = nicht detektierbar

Bei allen ausgewählten Furocumarin-UVA-Dosis-Kombinationen ist eine deutliche Abnahme der EC₅₀-Werte bei einer Verlängerung der Nachinkubationszeit von 48 h auf 72 h zu erkennen. Auch hier entsprechen die nach 72 h gefundenen EC₅₀-Werte eher den im HPRT-Assay und Mikrokerntest maximal einsetzbaren Konzentrationen als die EC₅₀-Werte nach 48 h, weshalb die Schlussfolgerung nahe liegt, dass bei allen getesteten FC-UVA-Kombinationen die EC₅₀-Werte nach 72 h die tatsächlichen phototoxischen Konzentrationen am besten beschreiben.

6.3.1 Resazurin-Reduktionstest, alle Reinsubstanzen

In Tab. 6.3.1 wurden die EC₅₀-Werte aller getesteten (Furo-)cumarine zusammengefasst und, soweit möglich, nach der Bestrahlung mit 125 mJ/cm² und nach 72 h Nachinkubationszeit bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit werden in Tab. 6.3.1 die berechneten EC₅₀-Werte sowohl in µg/ml Inkubationsmedium als auch in µmol angegeben. Zusätzlich wurden über die gefundenen EC₅₀-Werte die Phototoxizitäts-

Äquivalenzfaktoren (PTEFs) in Relation zum potentesten Furocumarin, 5-MOP, berechnet gemäß:

$$PTEF_{Furocumarin} = \frac{EC_{50,5-MOP}}{EC_{50,Furocumarin}}$$

Tab. 6.3.1: EC₅₀-Werte und PTEFs aller getesteten Furocumarine nach Bestrahlung mit 125 mJ/cm² und 72 h Nachinkubation

Substanz	EC ₅₀ / µg/ml	EC _{50,µM} / µmol	PTEF	PTEF _{µM}
5-MOP	3,3 ± 0,2	15,5 ± 1,1	1,000 ± 0,073	1,000 ± 0,073
8-MOP	17,0 ± 0,8	78,6 ± 3,6	0,197 ± 0,009	0,197 ± 0,009
Angelicin	(227,0 ± 143,6)	(1219,3 ± 771,3)	(0,015 ± 0,009)	(0,013 ± 0,008)
Bergamottin*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bergaptol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Byakangelicin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6',7'-Dihydroxy-bergamottin	30,1 ± 3,3	80,9 ± 8,7	0,111 ± 0,012	0,191 ± 0,021
Epoxybergamottin	18,7 ± 1,2	52,7 ± 3,4	0,179 ± 0,012	0,294 ± 0,019
Epoxybergamottin unbestrahlt	65,3 ± 7,9	184,2 ± 22,2	0,051 ± 0,006	0,084 ± 0,010
Heraclenin	56,7 ± 2,8	198,2 ± 9,7	0,059 ± 0,003	0,078 ± 0,004
Imperatorin	21,7 ± 1,5	80,3 ± 5,5	0,154 ± 0,010	0,193 ± 0,013
Isobergapten	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Isoimperatorin	(178,9 ± 106,8)	(662,0 ± 395,0)	(0,019 ± 0,011)	(0,023 ± 0,014)
Isopimpinellin*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Khellin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Limettin	73,7 ± 14,0	357,5 ± 68,0	0,045 ± 0,009	0,043 ± 0,008
Oxypeucedanin	9,6 ± 0,5	33,4 ± 1,9	0,350 ± 0,020	0,463 ± 0,026
Oxypeucedanin-hydrat	21,2 ± 2,4	69,6 ± 7,7	0,158 ± 0,017	0,222 ± 0,025
Pimpinellin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phellopterin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Psoralen*	12,0 ± 0,7	64,5 ± 3,7	0,278 ± 0,016	0,240 ± 0,014
Sphondin	45,0 ± 3,6	208,0 ± 16,6	0,074 ± 0,006	0,074 ± 0,006
Xanthotoxol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*Literaturdaten, berechnet aus (Lohr 2009, Lohr et al. 2010); n.d. = nicht detektierbar; Werte in Klammern (): nicht zuverlässig, da zu stark fehlerbehaftet und wegen der geringeren Wasserlöslichkeit des FCs nur theoretischer Natur

Für alle getesteten Furocumarin-Derivate konnten keine toxischen Effekte ohne Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht mit Ausnahme von Epoxybergamottin festgestellt werden. Der EC₅₀-Wert beträgt hier mit Bestrahlung 18,66 ± 1,21 µg/ml, ohne 65,28 ± 7,86 µg/ml. Daraus lässt der Photo-Irritation-Factor (PIF, vgl. 5.2.2) von PIF = 3,5 berechnen, womit Epoxybergamottin als „möglicherweise phototoxisch“ eingestuft werden kann, während der PIF bei den übrigen FCs aufgrund nicht bestimmbarer EC₅₀-Werte nicht berechnet werden kann (OECD 2004).

Es zeigen sich erhebliche Unterschiede in der Phototoxizität der unterschiedlichen Furocumarin-Derivate. Dabei zeigen unter den gewählten Bedingungen Bergamottin, Bergaptol, Byakangelicin, Isobergapten, Isopimpinellin, Khellin, Pimpinellin, Phellopterin und Xanthotoxol bis zu ihrer individuellen Löslichkeitsgrenze keinerlei phototoxische Effekte. Für die Phototoxizität der übrigen ergibt sich in Bezug auf ihre Masse folgende Reihenfolge:

5-MOP > Oxypeucedanin > Psoralen > 8-MOP > Epoxybergamottin > Oxypeucedaninhydrat \approx Imperatorin > 6',7'-Dihydroxybergamottin > Sphondin > Heraclenin > Limettin > Isoimperatorin \approx Angelicin. Bezüglich molarer Einheiten ändert sich diese Reihenfolge auf:

5-MOP > Oxypeucedanin > Epoxybergamottin > Psoralen > Oxypeucedaninhydrat > 8-MOP \approx Imperatorin \approx 6',7'-Dihydroxybergamottin > Heraclenin \approx Sphondin > Limettin > Isoimperatorin > Angelicin.

Hierbei sind die Ergebnisse für Isoimperatorin und Angelicin nicht verlässlich, da die gefundenen EC₅₀-Werte oberhalb des Löslichkeitsprodukts dieser FCs liegen, somit nur theoretischer Natur und generell stark fehlerbehaftet sind.

Auf die möglichen Ursachen und Bewertung dieser Ergebnisse wird ausführlich in der Diskussion (Kap. 7) eingegangen.

6.3.2 Resazurin-Reduktionstest, Mischungen

Zur Charakterisierung des Verhaltens von Furocumarinen im Resazurin-Reduktionstest wurde dieser an den Mischungen 1, 2, 5-8 und Angelika (vgl. Tab: 6.1) durchgeführt; aufgrund der begrenzten Substanzmenge konnte der Resazurin-Reduktionstest nicht mit allen Mischungen durchgeführt werden. Die erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden isobolographisch, über das PTEF-Konzept und CI-Werte analysiert.

6.3.2.1 Resazurin-Reduktionstest: Isobolographische Analyse

In Abb. 6.3.2.1 sind die Daten der Resazurin-Reduktionstests der mit 125 mJ/cm² UVA-Licht bestrahlten und mit 5-MOP, 8-MOP, Mix 1, 5 und 6 inkubierten V79-Zellen als Isobologramm dargestellt. Als zu vergleichender Effekt wurde der EC₅₀-Wert gewählt.

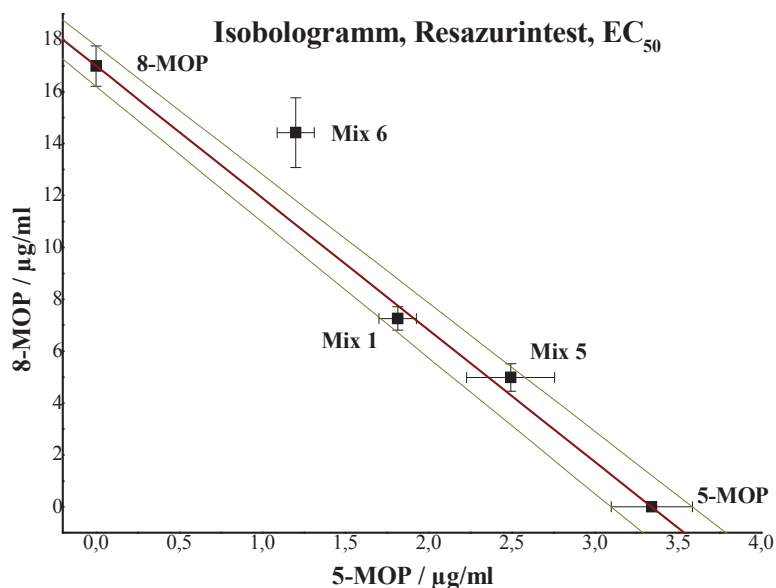


Abb. 6.3.2.1: Isobologramm von 5-MOP und 8-MOP im Resazurin-Reduktionstest. Dargestellt ist 8-MOP als Funktion von 5-MOP, als zu betrachtender Effekt wurde der EC₅₀-Wert gewählt. Zugrundeliegende Daten sind die EC₅₀-Werte der mit 125 mJ/cm² UVA-Licht bestrahlten Inkubationen mit den Reinstoffen 5-MOP, 8-MOP und deren Mischungen Mix 1, Mix 5 und Mix 6 (vgl. Tab. 6.1), die angegebenen Fehler wurden aus den Fehlern der Linearregressionen berechnet (5-MOP n=9, 8-MOP n=4, Mix1 n=8, Mix5 n=5, Mix6 n=5)

Die in Abb. 6.3.2.1 dargestellte weinrote Gerade ist die Isobole der Konzentrationen der beiden Reinsubstanzen 5-MOP und 8-MOP, die jeweils für sich alleine eine Verringerung der Vitalität im Resazurin-Reduktionstest in Kombination mit einer UVA-Dosis von 125 mJ/cm² auf 50% bewirken. Sie ist die (theoretische) Konturlinie, auf der alle beliebigen Konzentrations-Kombinationen von 5-MOP und 8-MOP, die den gleichen Effekt (Absenkung der Vitalität auf 50%) bewirken, liegen sollten (Iso-Effekt-Linie), unter der Annahme, dass das Konzept der Dosis-Additivität anwendbar ist. Die aus den EC₅₀-Werten der Mischungen 1 und 5 stammenden Konzentrationen von 5-MOP und 8-MOP liegen innerhalb der Fehlergrenzen auf der Isobole, die Werte von Mix 6 darüber. Dennoch kann aufgrund der Werte von Mix 1 und 5 nicht auf einen konkaven Verlauf der realen Isobole und somit auf eine antagonistische Wechselwirkung im Falle dosisadditiven Verhaltens geschlossen werden.

6.3.2.2 Vergleich über PTEF-Konzept / Interaktions-Index CI

In Tab. 6.3.2.2 finden sich neben der nach $CI = \sum_{i=1}^n d_i / D_i$ berechneten Interaktions-Indizes

CI die EC₅₀ -Werte der getesteten Mischungen in Gewichts-Phototoxizitäts-Äquivalenten (PTEQ) in µg/ml PTEQ. Berechnet wurden diese EC₅₀-Werte analog zu Reinsubstanzen aus der Auftragung Vitalität (% Medium) gegen die logarithmische Konzentration von PTEQ. Diese wiederum wurden aus den in Tab. 6.3.1 bestimmten PTEFs nach

$$PTEQ[\mu g / ml] = \sum_{i=1}^n PTEF_i \times Konz._i[\mu g / ml] \text{ berechnet.}$$

Tab. 6.3.2.2: EC₅₀-Werte und CI-Werte aller getesteten Furocumarin-Mischungen nach Bestrahlung mit 125 mJ/cm² und 72h Nachinkubation, die PTEQ-EC₅₀-Werte wurden aus den PTEFs (Tab. 6.3.1) berechnet.

Mischung	EC ₅₀ / µg/ml PTEQ	CI
5-MOP	3,3 ± 0,2	1 ± 0,07
Mix 1	3,2 ± 0,2	0,97 ± 0,06
Mix 2	7,3 ± 0,5 ###	2,19 ± 0,17 ###
Mix 5	3,5 ± 0,4	1,04 ± 0,11
Mix 6	4,0 ± 0,4 #	1,33 ± 0,17 #
Mix 7	3,0 ± 0,2	0,89 ± 0,07
Mix 8	2,6 ± 0,2 #	0,77 ± 0,05 #
Angelika	4,6 ± 0,2 ###	1,37 ± 0,07 ###

Statistische Behandlung: Mischung vs. 5-MOP: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # ≤ 0,05, ### ≤ 0,001), n=4-9

Im Rahmen des Konzepts der Dosis-Additivität unter der Annahme, dass keine Wechselwirkung stattfindet, alle FCs das gleiche Target haben und sich nur in ihrer Potenz unterscheiden, sollten die EC₅₀-Werte der PTEQs der Mischungen identisch und die CI-Werte gleich 1 sein. Dies trifft auf die EC₅₀- und CI- Werte von Mix 1, 5 & 7 zu; sie unterscheiden sich im Rahmen der durch den sigmoidalen Fit bedingten Fehler nicht signifikant. Etwas größere, signifikante Abweichungen größer bzw. kleiner 1 ergeben sich für Mix 6 bzw. 8, für Mix 2 und Angelika sogar höchst signifikante Abweichungen auf Werte größer 1. Letztere Mischungen enthalten jedoch Limettin bzw. Byakangelicin, Phellopterin und Isopimpinellin, die nur gering oder gar nicht phototoxisch sind, wie in Tab. 6.3.1 gezeigt. Das führt einerseits zu Problemen beim sigmoidalen Fit und somit Ungenauigkeiten bei der Bestimmung des EC₅₀-Wertes. Andererseits könnten sie möglicherweise kompetitiv die Targets für phototoxischere Furocumarine blockieren und somit in einer FC-Mischung antagonistisch wirken, was durch die CI-Werte größer 1 und erhöhte EC₅₀-Werte bestätigt werden könnte. Aufgrund der Komplexität der Mischungen und des damit verbundenen Probenaufwands ist eine detaillierte Überprüfung kaum möglich. Im Rahmen dieser Arbeit kann jedoch exemplarisch für 5-MOP und 8-MOP überprüft werden, ob die Theorie der strikt Dosis-additiven Phototoxizität generell haltbar ist. Hierzu wird eine von Cassee (1998) und Pöch (1980 & 1990), vorgeschlagene Methode benutzt, bei der die Dose-Response Curve (DRC) der Reinsubstanz A der DRC von Substanz A in Kombination mit einer fixen Dosis B gegenübergestellt und mit theoretischen DRCs für dosisadditive oder unabhängige Wirkungen verglichen wird. Dabei können über die Form und Richtung der Verschiebung der DRC des Reinstoffs A Aussagen darüber getroffen werden, ob es sich um Dosis- oder Effektadditivität oder um additive, subadditive oder supraadditive Kombinationseffekte handelt. Abb. 6.3.2.2a zeigt die Ergebnisse des Resazurintests von 5-MOP in variablen Konzentrationen ohne und mit Zusatz von 10 bzw. 20 µg/ml 8-MOP (fixe Konzentration) in der Auftragung relative Vitalität gegen die logarithmierte 5-MOP-Konzentration mit sigmoidalem Fit nach der Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht:

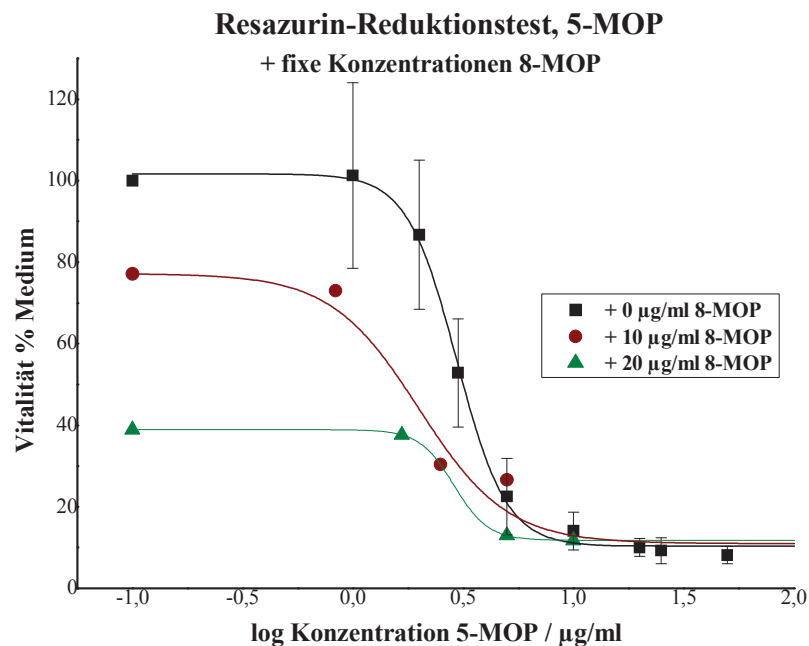


Abb. 6.3.2.2a: Sigmoidale Fits der Ergebnisse des Resazurintests von variablen 5-MOP-Konzentrationen (bestrahlt mit 125 mJ/cm², 72 h Nachinkubation) ohne und mit Zusatz von 10 bzw. 20 μg/ml 8-MOP (fixe Konz.), aufgetragen ist relative Vitalität gegen logarithmierte 5-MOP-Konzentration

Zu erkennen ist bei allen drei DRC eine 5-MOP-konzentrationsabhängige Abnahme der relativen Vitalität in einem sigmoidalen Verlauf. Dabei werden die DRCs nach oben durch den von der jeweiligen 8-MOP-Konzentration verursachten Effekt (verbleibende relative Vitalität) begrenzt: bei 0 μg/ml 8-MOP (schwarz) ist erwartungsgemäß keine Vitalitätsabnahme zu erkennen, d.h. die rel. Vitalität beträgt 100%, 10 μg/ml (braun) bzw. 20 μg/ml (grün) verursachen jeweils alleine eine anfängliche Reduktion der Vitalität auf ca. 77% bzw. 39%. Davon ausgehend reduziert sich die Vitalität bei allen drei DRCs auf den gleichen Wert von etwa 10-11%, was trotz gewisser Schwankungen und unzureichender Datenpunkte bei 10 μg/ml 8-MOP zumindest für 0 μg/ml bzw. 20 μg/ml 8-MOP festgehalten werden kann.

Abb. 6.3.2.2b zeigt die mit Abb. 6.3.2.2a zu vergleichenden theoretischen DRCs für Dosis- (links) und Effekt-Additivität (rechts) nach (Pösch et al. 1990):

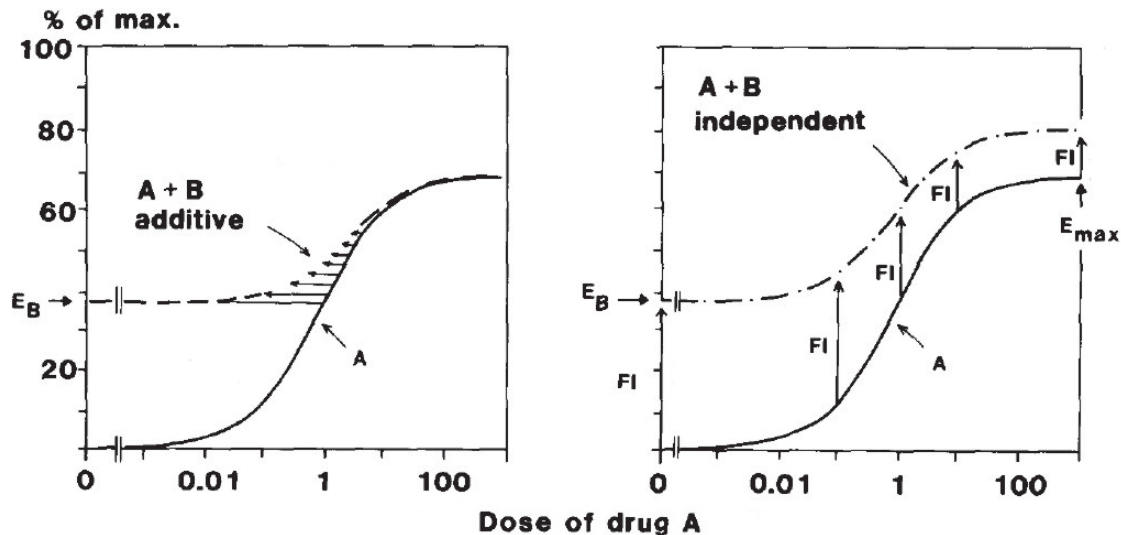


Abb. 6.3.2.2b: Theoretische DRCs für binäre Mischungen aus Stoff A mit variabler Konzentration und Stoff B mit fixer Konzentration. Aufgetragen ist die relative maximale Systemantwort gegen die logarithmierte Konzentration von A, links für Dosis-additives, rechts für unabhängig Effekt-additives Verhalten der Mischung, modifiziert nach (Pöch et al. 1990) mit E_B = Effekt durch Stoff B alleine, E_{max} = maximaler Effekt von A, FI = fraction of increase, Anteil von B an Systemantwort

Bei beiden Graphen ist der Anfangswert der Mischung von A und B jeweils um den Effekt von B alleine gegenüber der sigmoidalen DRC von A verschoben. Bei Erhöhung der Konzentration von A und bei Erreichen der maximalen von A ausgelösten Systemantwort sind Unterschiede zu erkennen: Bei dosisadditivem Verhalten (links) nähern sich die DRCs von A und der Kombination A + B dem gleichen Maximalwert an, bei der Wirkungs-(Effekt)-Additivität ist die DRC der Kombination von A + B jeweils um die FI (fraction of increase, d.h. den Anteil von B an der Systemantwort) Richtung maximaler Systemantwort verschoben und zeigt so einen höheren Maximalwert der DRC als die des Reinstoffs A (Cassee et al. 1998, Pöch et al. 1990).

Betrachtet man die relative Vitalität aus Abb. 6.3.2.2a als prozentualen Anteil des Ursprungszustands, entspräche ein Absinken der Vitalität auf 0 % einer Systemantwort von 100% in Abb. 6.3.2.2b, weshalb die Ergebnisse des Resazurintests direkt mit den theoretischen DRCs verglichen werden können. Es ist deutlich zu erkennen, dass die hier gemessenen DRCs für 5-MOP + 8-MOP praktisch identisch mit den theoretischen DRCs für dosisadditives Verhalten sind.

Würden weiterhin 5-MOP und 8-MOP zwar über den gleichen Mechanismus wirken, aber in Mischungen subadditives (z.B. durch Konkurrenz um die gleiche Bindungsstelle) bzw. supraadditives Verhalten aufweisen, würde sich die DRC entlang der x-Achse in Richtung höherer bzw. niedrigerer Konzentrationen verschieben (Pöch and Holzmann 1980). Diese kann anhand der Daten aus Abb. 6.3.2.2a nicht gezeigt werden, weshalb insgesamt davon auszugehen ist, dass Mischungen aus 5-MOP und 8-MOP im Resazurin-Reduktionstest strikt der Dosis-Additivität folgen.

6.4 Photo-HPRT-Genmutationstest

In diesem Kapitel werden die Zusammenhänge zwischen Furocumarin-Konzentration und UVA-Dosis und deren Einfluss auf die Mutationsfrequenz am Beispiel von 5-MOP und Angelicin untersucht, die in Tab. 2.5.1a und 2.5.1b aufgeführten Furocumarine, Limettin und Khellin hinsichtlich ihrer relativen photomutagenen Potenz bei einer UVA-Dosis von 125 mJ/cm² verglichen und deren Verhalten in den in Tab. 6.1 erläuterten Mischungen charakterisiert.

Da unter Lichtausschluss keine oder nur sehr geringfügige mutagene Effekte zu erwarten waren und somit im Rahmen der intrinsischen Schwankungen dieses Assays ohnehin keine Dosis-Wirkungsbeziehungen ermittelbar wären, wurden die zur Kontrolle mitgeführten unbestrahlten Proben nur in der höchsten verwendeten Furocumarin-Konzentration getestet. Diese sind neben den allgemeinen Negativkontrollen, reinem Inkubationsmedium und 0,5% DMSO, sowohl unbestrahlt als auch mit 125 mJ/cm² UVA-Licht bestrahlt, und der Positivkontrolle *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG, 20 µM), die sich in Vorversuchen als am besten geeignet erwies, in Abb. 6.4 dargestellt:

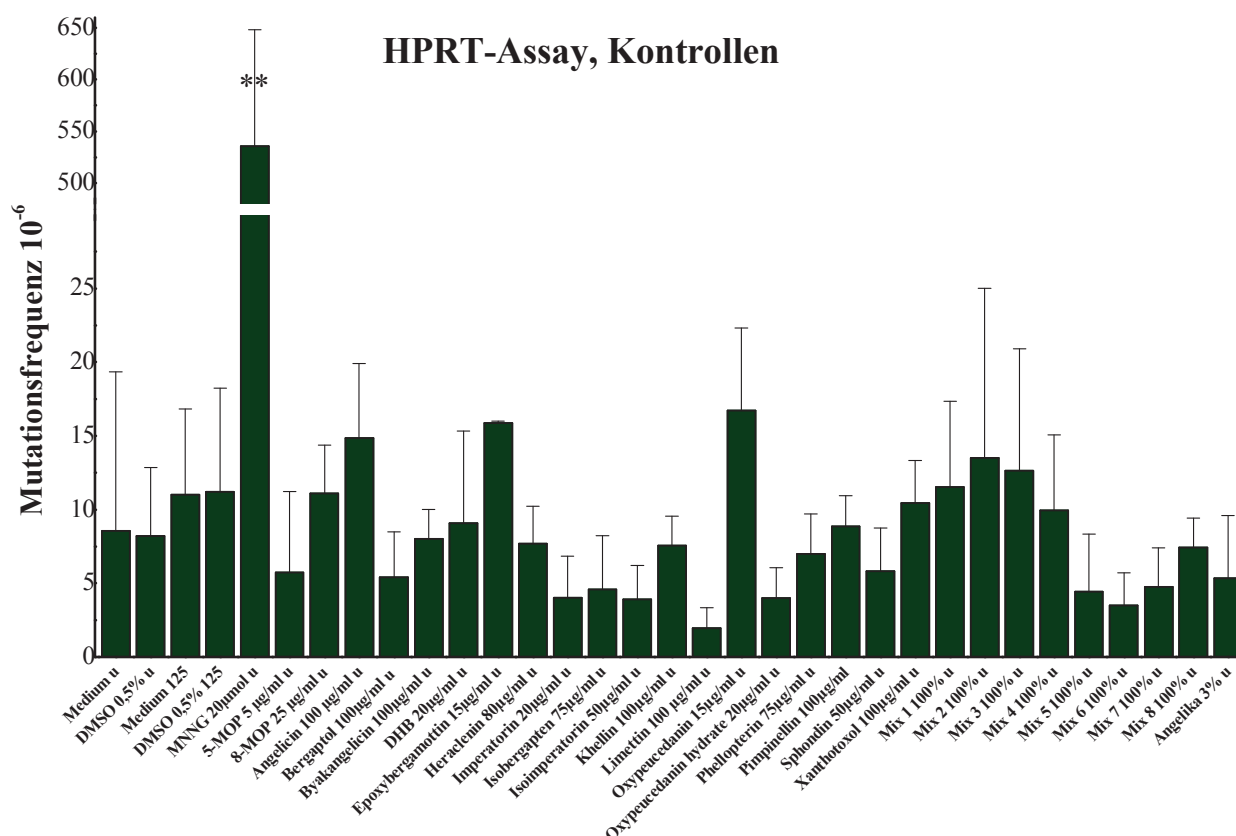


Abb. 6.4: Im HPRT-Assay verwendete Kontrollen: Als Positivkontrolle dient MNNG (20 µM), als Negativkontrollen dienen das reine Medium und das Lösemittel DMSO 0,5%, sowohl unbestrahlt (u) als auch mit 125 mJ/cm² UVA-Licht bestrahlt (125), und die unbestrahlten, höchsten eingesetzten Konzentrationen aller (Furo-)cumarine und deren Mischungen (n=3-9; p-value: DMSO u vs. Behandlung: one-way ANOVA+Dunnett's post test, ** ≤ 0,01)

In Abb. 6.4 ist zu erkennen, dass alle verwendeten Negativkontrollen zwar für diesen Assay nicht unüblichen Schwankungen unterliegen, die gefundenen Mutationsfrequenzen sich aber nicht signifikant von der unbestrahlten Lösemittelkontrolle ($MF = 8,2 \pm 4,7 * 10^{-6}$) unterscheiden. Sowohl die bestrahlten als auch unbestrahlten Medium- und Lösemittelkontrollen liegen im Bereich von $MF \approx 10 * 10^{-6}$, wodurch gezeigt wird, dass die applizierte UVA-Dosis von 125 mJ/cm^2 wie gefordert (OECD 2004) alleine keinen Einfluss auf die Mutationsfrequenz hat. Als Referenz-Negativkontrolle wird die bestrahlte DMSO-Probe mit $11,2 \pm 7,1 * 10^{-6}$ gewählt, die im Bereich der von Bradley et al. (1981) empfohlenen Höchstgrenze für MF_0 liegt. Weiterhin wird auch durch die Inkubation mit Furocumarinen und ihren Mischungen alleine ohne Bestrahlung die spontane Mutationsfrequenz nicht signifikant beeinflusst. Alleine die Positivkontrolle MNNG ($20 \text{ }\mu\text{M}$) verursacht einen sehr signifikanten Anstieg der Mutationsfrequenz auf $535,5 \pm 112,6 * 10^{-6}$, wodurch die Methode als valide betrachtet werden kann (Bradley et al. 1981).

6.4.1. Photo-HPRT-Assay: Zusammenhang Furocumarin-Konzentration / UVA-Dosis

Am Beispiel von 5-Methoxypsoralen, einem bifunktionalen, weitverbreiteten und dem im Rahmen dieser Arbeit potentesten Furocumarin, und Angelicin, einem monofunktionalen und weniger potenten FC, wurden detailliertere Untersuchungen zur Photomutagenität durchgeführt. Hierbei sollen Erkenntnisse über den quantitativen Zusammenhang zwischen der Substanzkonzentration und der UVA-Dosis gewonnen werden.

Hierzu wurden zunächst mit variablen 5-MOP-Konzentrationen inkubierte V79-Zellen in fünf verschiedenen Versuchsreihen mit fixen UVA-Dosen von $50 - 200 \text{ mJ/cm}^2$ bestrahlt und die ermittelten Mutationsfrequenzen gegen die 5-MOP-Konzentration aufgetragen, wie in Abb. 6.4.1a A-E zu sehen:

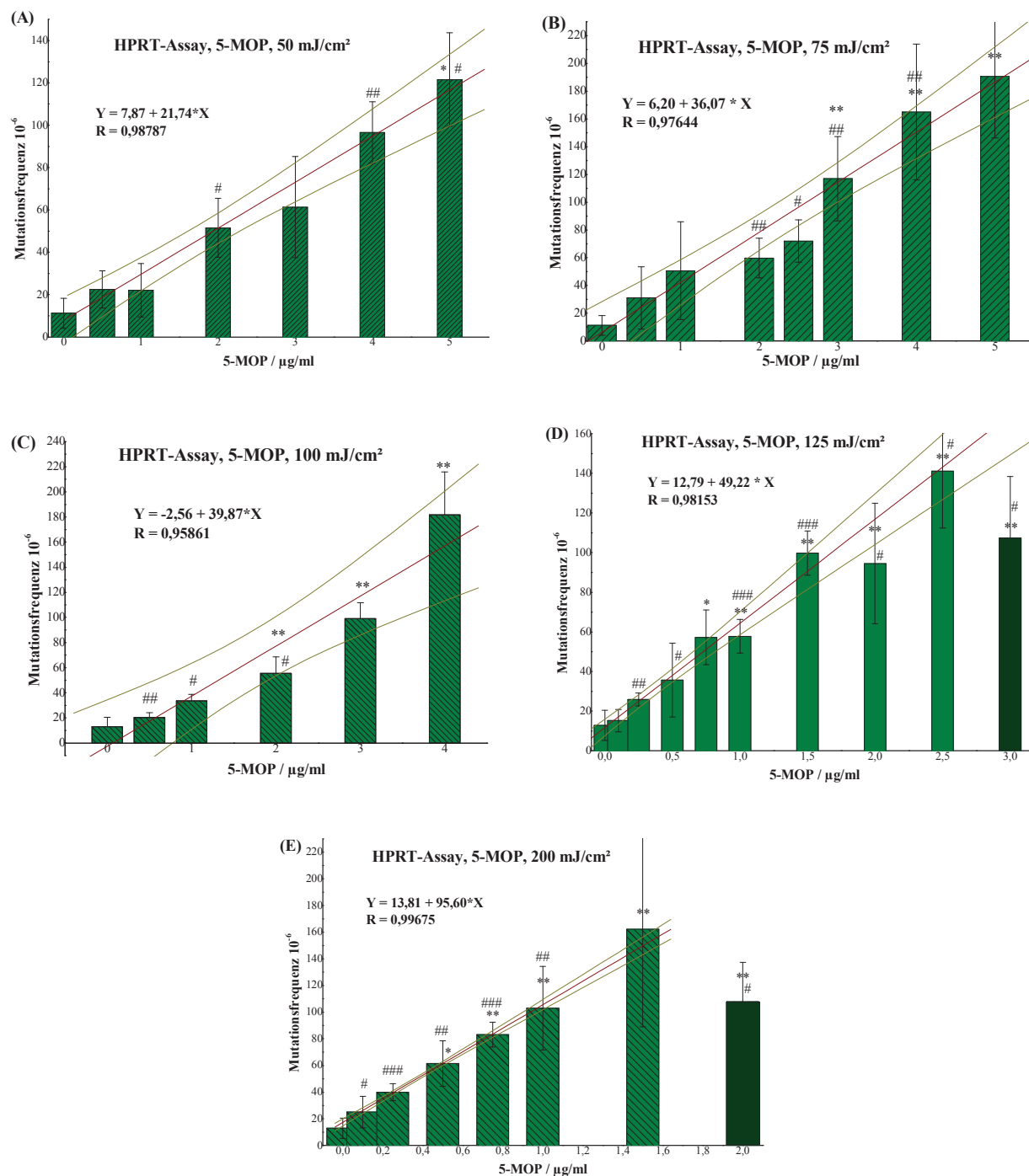


Abb. 6.4.1a A-E: HPRT-Assay zur Erfassung photogentoxischer Effekte von 5-MOP. Dargestellt sind die Auftragungen der Mutationsfrequenzen gegen variable 5-MOP-Konzentrationen bei Bestrahlung mit verschiedenen UVA-Dosen (50 (A), 75 (B), 100 (C), 125 (D), 200 (E) mJ/cm²) und die zugehörigen Linearregressionen mit einem 95%-Konfidenz-Intervall; dunkelgrüne Balken: wegen Zytotoxizität nicht berücksichtigte Werte (n=3-5; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # $\leq 0,05$, ## $\leq 0,01$, ### $\leq 0,001$)

In Abb. 6.4.1a ist zu erkennen, dass bei allen fünf verschiedenen UVA-Dosen (50-200 mJ/cm²) im noch nicht zytotoxischen Bereich (dunkelgrüne Balken) ein strikt linearer Zusammenhang zwischen der Mutationsfrequenz und der 5-MOP-Konzentration besteht. Unterschiede zwischen den Strahlungsdosen sind nur in der Steilheit der Regressionsgeraden auszumachen, die von $21,74 \pm 3,71$ Kolonien* μg^{-1} *ml (50 mJ/cm²) bis zu $95,60 \pm 3,87$ (200 mJ/cm²) Kolonien* μg^{-1} *ml reichen; diese sind in Tab. 6.4.1a aufgelistet. Die lineare Abhängigkeit deckt sich mit den Ergebnissen von Chiou und Yang (1995), die ebenfalls einen linearen Zusammenhang zwischen der Mutationsfrequenz und der 8-MOP-Konzentration in HWF diploiden humanen Fibroblasten bei konstanter UVA-Dosis fanden, genau wie Van Zeeland et al. (1989) mit verschiedenen alkylierenden Agenzien in V79-Zellen, weshalb ein ähnlicher linearer Verlauf auch für 5-MOP zu erwarten war.

Tab. 6.4.1a: Steigung der Linearregressionen der Auftragungen MF gegen 5-MOP-Konzentration bei verschiedenen UVA-Dosen

UVA-Dosis / mJ/cm ²	Steigung Linearregression / Kolonien* μg^{-1} *ml
50	$21,74 \pm 3,71$
75	$36,07 \pm 3,25$
100	$39,87 \pm 5,92$
125	$49,22 \pm 3,63$
200	$95,60 \pm 3,87$

In einer alternativen Auftragung, Abb. 6.4.1b A-D, wird bei vier verschiedenen fixen 5-MOP-Konzentrationen (0,5, 1, 2, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) die Abhängigkeit der Mutationsfrequenz von der UVA-Dosis untersucht:

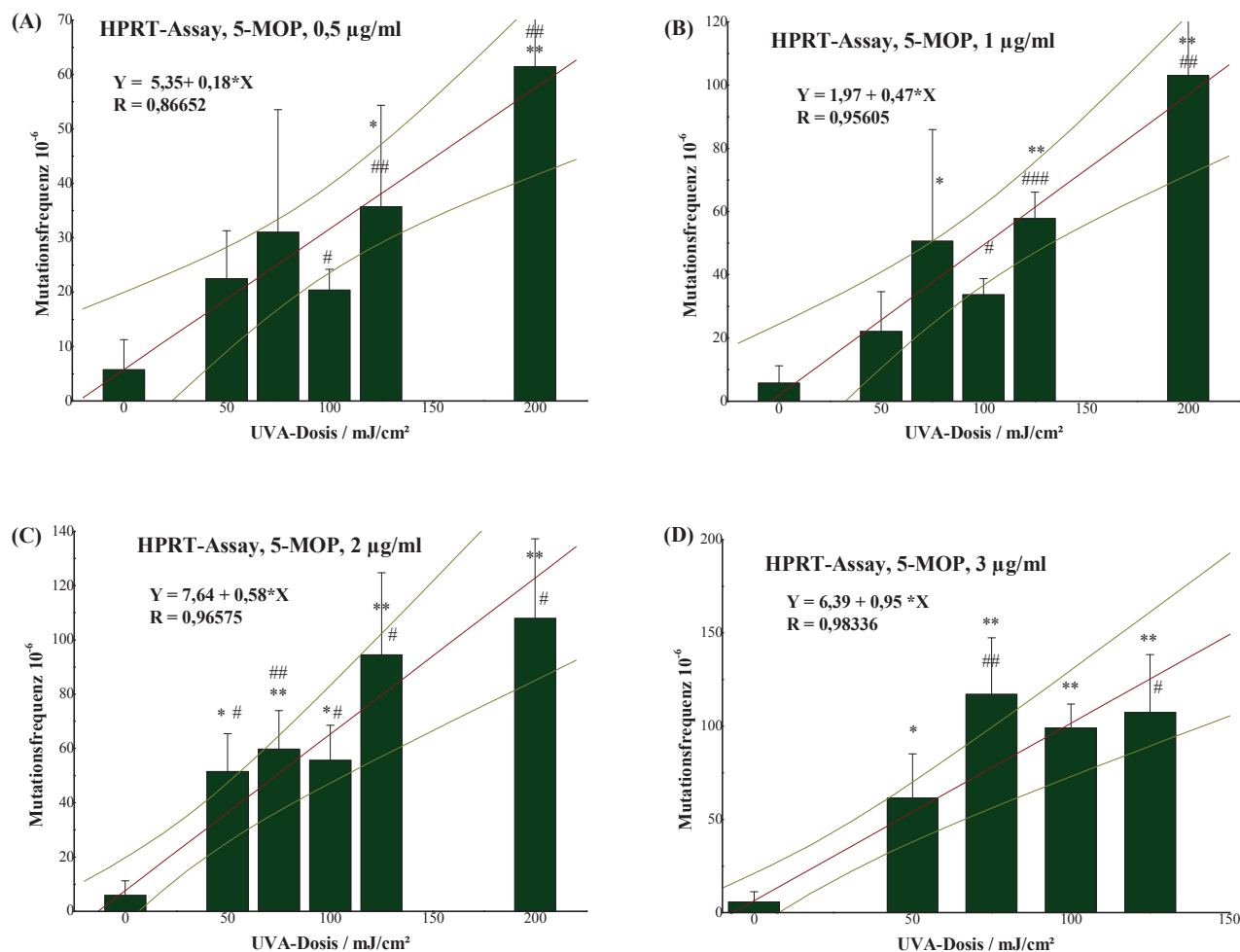


Abb. 6.4.1b A-D: HPRT-Assay zur Erfassung photogentoxischer Effekte von 5-MOP. Dargestellt sind die Auftragungen der Mutationsfrequenzen gegen variable UVA-Dosen bei fixen 5-MOP-Konzentrationen (0,5 (A), 1 (B), 2 (C), 3 (D) µg/ml) und die zugehörigen Linearregressionen mit einem 95%-Konfidenz-Intervall (n=3-5; p-value: unbestrahlt vs. bestrahlt: *one-way ANOVA+Dunnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01, ### ≤ 0,001)

In den Abbildungen 6.4.1b A-D ist im Rahmen der Standardabweichungen ein ebenfalls linearer Anstieg in der Auftragung Mutationsfrequenz gegen UVA-Dosis bei allen vier verschiedenen fixen 5-MOP-Konzentrationen bei noch nicht stark zytotoxischen Kombinationen zu erkennen. Diese unterscheiden sich wiederum nur in der Steigung ihrer Regressionsgeraden, die von $0,18 \pm 0,06$ Kolonien*mJ⁻¹*cm² (0,5 µg/ml) bis $0,95 \pm 0,12$ Kolonien*mJ⁻¹*cm² (3 µg/ml) in Abhängigkeit von der 5-MOP-Konzentration ansteigen, was in Tab. 6.4.1b zusammengefasst ist:

Tab. 6.4.1b: Steigung der Linearregressionen der Auftragungen MF gegen UVA-Dosis bei verschiedenen 5-MOP-Konzentrationen

5-MOP-Konzentration / µg/ml	Steigung Linearregression / Kolonien*mJ ⁻¹ *cm ²
0,5	$0,18 \pm 0,06$
1	$0,48 \pm 0,07$
2	$0,58 \pm 0,09$
3	$0,95 \pm 0,12$

Ähnliche lineare Abhängigkeiten von der UVA-Dosis wurden auch z.B. von Schimmer (1980) und Schimmer & Abel (1986) für die Reversion von Arginin-defizienten *Chlamydomonas reinhardtii*-Mutanten in Kombination mit 5-MOP, 8-MOP, Heraclenin und Imperatorin gezeigt, oder von Babudri (1981) für die HPRT-MF von V79-Zellen mit 8-MOP. Zudem zeigte Nocentini (1986) einen linearen Anstieg der 8-MOP-Adduktbildung in Jac humanen Fibroblasten in Abhängigkeit der UVA-Dosis.

Trägt man die in Tab. 6.4.1a ermittelten Steigungen der Linearregressionen gegen die UVA-Dosis auf, ergeben sich wiederum lineare Zusammenhänge (Abb. 6.4.1c):

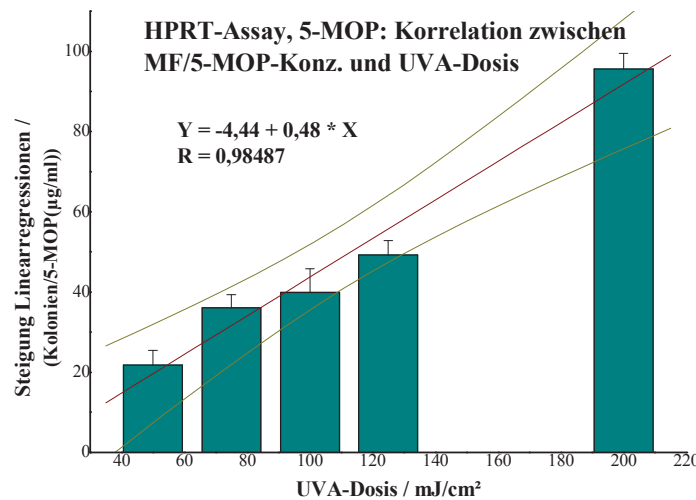


Abb. 6.4.1c: Abhängigkeit der Steigungen der Linearregressionen [Kolonien / μg/ml 5-MOP] der Auftragungen MF gegen 5-MOP-Konz. bei unterschiedlichen UVA-Dosen aus Abb. 6.4.1a A-E von der UVA-Dosis (n=3-5; Fehlerbalken = Fehler Linearregressionen) und die zugehörigen Linearregressionen mit einem 95%-Konfidenz-Intervall

Somit kann die Korrelation zwischen der Erhöhung der Mutationsfrequenz MF, also der Photomutagenität, der UVA-Dosis und der 5-MOP Konzentration unter Einführung eines Proportionalitätsfaktors f wie folgt dargestellt werden:

$$[Photomutagenität]_{5-MOP} = f * [UVA - Dosis] * [Konz.]_{5-MOP}$$

Dies kann in Hinblick auf die Daten aus Abb. 6.4.1a A-E und Tab. 6.4.1a bei Experimenten mit jeweils konstanter UVA-Dosis ausgedrückt werden als (Raquet and Schrenk 2009):

$$f = \frac{Steigung_{[UVA-Dosis]=konst.}}{[UVA - Dosis]}$$

Der Proportionalitätsfaktor f wurde für diese Daten berechnet und in Tab. 6.4.1c dargestellt:

Tab. 6.4.1c: Steigung der Linearregressionen der Auftragungen MF gegen 5-MOP-Konzentration bei verschiedenen UVA-Dosen und dazugehöriger Proportionalitätsfaktor f

UVA-Dosis / mJ/cm ²	Steigung Linearregression / Kolonien* μg^{-1} *ml	Proportionalitätsfaktor f / Kolonien*cm ² *ml*mJ ⁻¹ * μg^{-1}
50	21,74 \pm 3,71	0,44 \pm 0,07
75	36,07 \pm 3,25	0,48 \pm 0,04
100	39,87 \pm 5,92	0,40 \pm 0,06
125	49,22 \pm 3,63	0,39 \pm 0,03
200	95,60 \pm 3,87	0,48 \pm 0,02

Der Proportionalitätsfaktor f variiert bei den getesteten UVA-Dosen zwischen $0,39 \pm 0,03$ und $0,48 \pm 0,04$ und ist somit relativ stabil über einen großen UVA-Dosis-Bereich; die Höhe der benutzten UVA-Dosis hat keinen offensichtlichen Einfluss auf f . Somit kann auch hier gezeigt werden, dass die Wahl der UVA-Dosis keinen Einfluss auf f und somit auf die photomutagene Potenz von 5-MOP hat, weshalb zu deren Bestimmung jede beliebige UVA-Dosis eingesetzt werden kann und die Wahl aus Gründen der praktikablen Versuchsdurchführung getroffen werden kann.

An dieser Stelle soll nun noch einmal die synergistische Wechselwirkung zwischen der 5-MOP-Konzentration und der UVA-Dosis überprüft werden, da diese auch im HPRT-Assay analog zu den Ergebnissen des Resazurin-Tests (Abb. 6.2.3c) und denen von Yurkow und Laskin (1991) zu erwarten ist. Dazu wird isobolographisch die UVA-Dosis als Funktion der 5-MOP-Konzentration aufgetragen. Als zu betrachtender Effekt wird eine Mutationsfrequenz von $100 \cdot 10^{-6}$ gewählt (Abb. 6.4.1d):

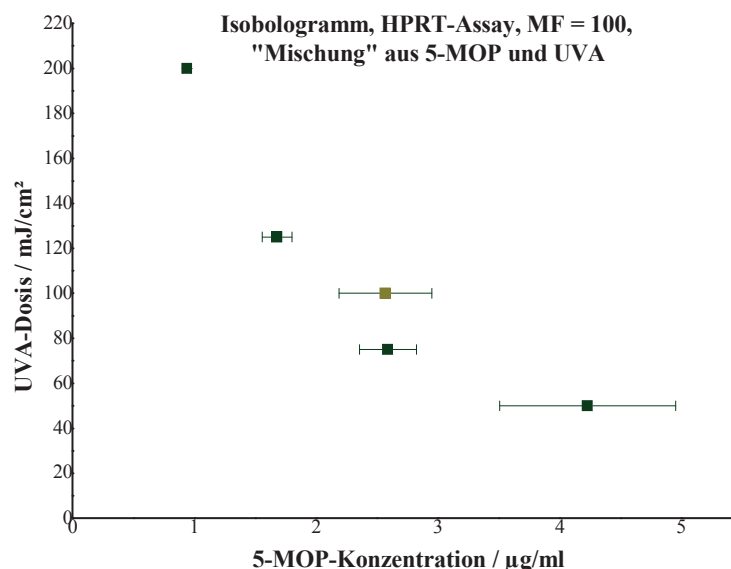


Abb. 6.4.1d: Isobolographische Darstellung der 5-MOP-/UVA-Kombinationen, die im HPRT-Assay zu einer Mutationsfrequenz von $100 \cdot 10^{-6}$ als zu betrachtendem Effekt führen, mit der UVA-Dosis als Funktion der 5-MOP-Konzentration

Da weder 5-MOP noch UVA-Licht alleine eine Erhöhung der MF auf $100 \cdot 10^{-6}$ bewirken können, kann auch hier keine Ausgleichsgerade gefittet werden; dennoch ist zu erkennen, dass, mit einer leichten Varianz des Wertes bei 100 mJ/cm^2 , die Werte entlang einer konkaven Linie liegen, weshalb auch hier eine synergistische Wechselwirkung der UVA-Strahlung und der 5-MOP-Konzentration vorliegt.

Um weiterhin die Annahme zu überprüfen, ob die konstanten Werte des Proportionalitätsfaktors f (Tab. 6.4.1c) in der Gleichung der Mutationsfrequenz als Funktion von FC-Konzentration und UVA-Dosis auch auf alle, auch weniger potente Furocumarine übertragbar ist, wurden identische Versuche und Berechnungen auch für das monofunktionale Angelicin durchgeführt. Abb. 6.4.1d A-E zeigt die Ergebnisse fünf verschiedener HPRT-Tests mit jeweils variablen Angelicin-Konzentrationen und fixen UVA-Dosen, Tab. 6.4.1d die Steigungen der dazugehörigen Linearregressionen und die Proportionalitätsfaktoren f .

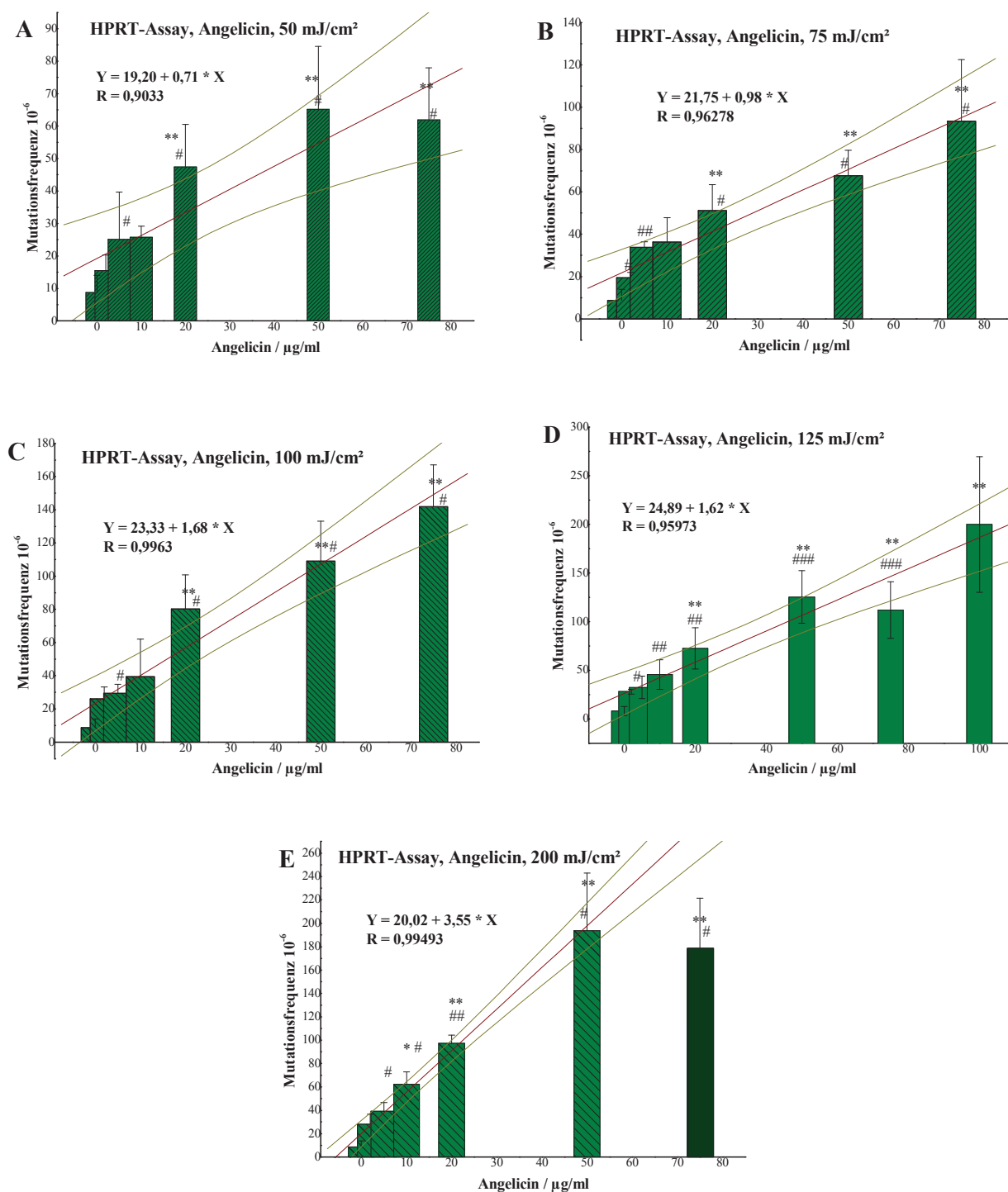


Abb. 6.4.1d A-E: HPRT-Assay zur Erfassung photogentoxischer Effekte von Angelicin. Dargestellt sind die Auftragungen der Mutationsfrequenzen gegen variable Angelicin-Konzentrationen bei Bestrahlung mit verschiedenen UVA-Dosen (50 (A), 75 (B), 100 (C), 125 (D), 200 (E) mJ/cm²) und die zugehörigen Linearregressionen mit einem 95%-Konfidenz-Intervall; dunkelgrüne Balken: wegen Zytotoxizität nicht berücksichtigte Werte (n=3-6; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01, ### ≤ 0,001)

Tab. 6.4.1d: Steigung der Linearregressionen der Auftragungen MF gegen Angelicin-Konzentration bei verschiedenen UVA-Dosen

UVA-Dosis / mJ/cm ²	Steigung Linearregression / Kolonien*μg ⁻¹ *ml	Proportionalitätsfaktor f / Kolonien*cm ² *ml*mJ ⁻¹ *μg ⁻¹
50	0,71 ± 0,15	0,014 ± 0,003
75	0,98 ± 0,12	0,013 ± 0,002
100	1,68 ± 0,18	0,017 ± 0,002
125	1,62 ± 0,19	0,013 ± 0,002
200	3,55 ± 0,18	0,018 ± 0,001

Auch für Angelicin sind bei allen fünf UVA-Dosen Angelicin-konzentrationsabhängige lineare Anstiege der Mutationsfrequenz zu sehen, die sich lediglich in der Steigung ihrer Regressionsgeraden unterschieden und von $0,71 \pm 0,15$ Kolonien*μg⁻¹*ml (50 mJ/cm²) bis $3,55 \pm 0,18$ (200 mJ/cm²) Kolonien*μg⁻¹*ml reichen. Diese liegen erwartungsgemäß nicht in der gleichen Größenordnung wie die von 5-MOP, sondern alle bei vergleichbarer UVA-Dosis ca. um den Faktor 30 darunter (Bordin et al. 1991, Raquet and Schrenk 2009, Scott et al. 1976). Der Proportionalitätsfaktor f variiert ebenfalls ohne ersichtliche Abhängigkeit von der UVA-Dosis von $0,013 \pm 0,002$ (75 und 125 mJ/cm²) bis $0,018 \pm 0,001$ (200 mJ/cm²) und schwankt damit nur wenig stärker als der von 5-MOP. Somit kann auch das photomutagene Potential von Angelicin als UVA-dosisunabhängig angenommen werden, was die Hypothese stützt, dass das photomutagene Potential aller in dieser Arbeit untersuchten (Furo-)cumarine bei relativ beliebigen UVA-Dosen bestimmt werden kann, weshalb auch für den Photo-HPRT-Assay eine Standard-UVA-Dosis von 125 mJ/cm² festgelegt wird.

Analog zu Abb. 6.4.1b A-D zeigt Abb. 6.4.1e A-D bei vier verschiedenen fixen Angelicin-Konzentrationen (10, 20, 50, 75 μg/ml) die Abhängigkeit der Mutationsfrequenz von der UVA-Dosis:

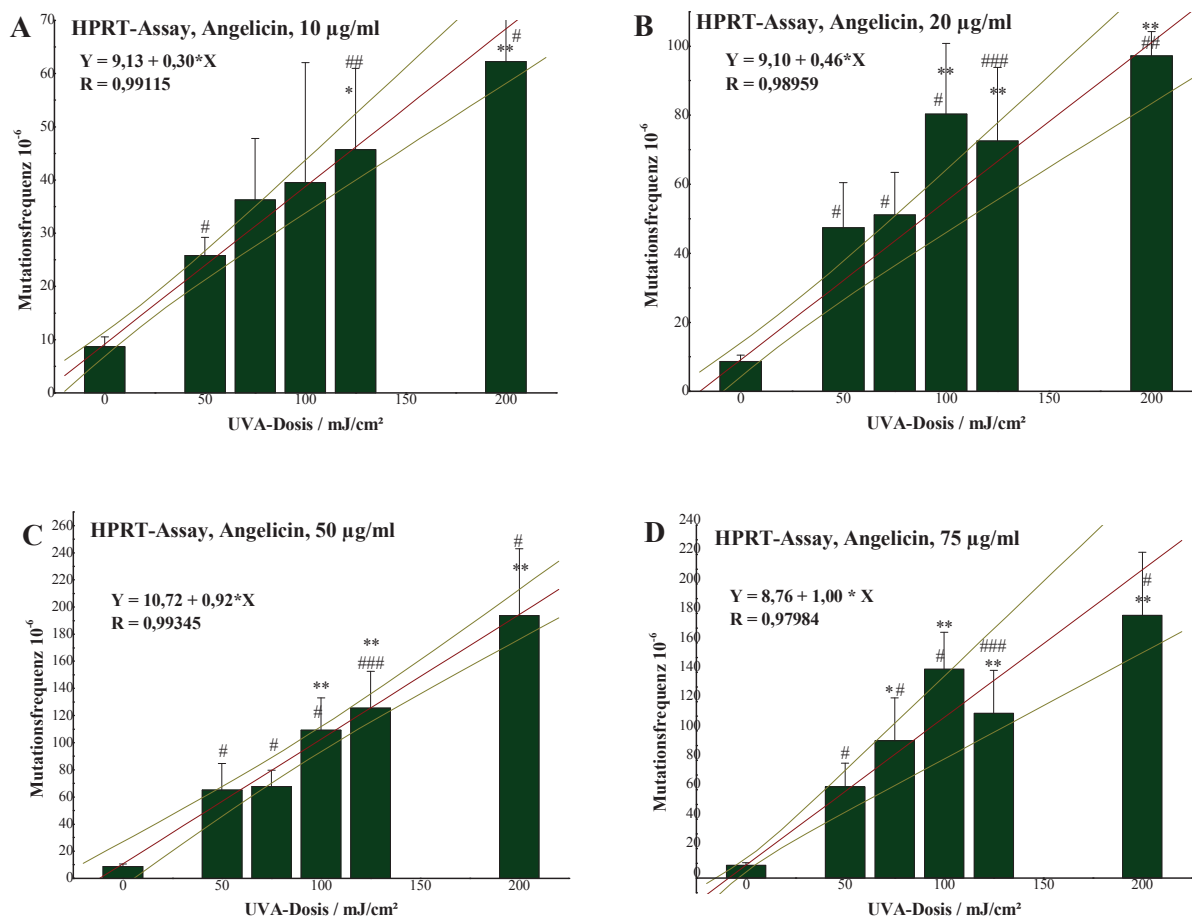


Abb. 6.4.1e A-D: HPRT-Assay zur Erfassung photogentoxischer Effekte von Angelicin. Dargestellt sind die Auftragungen der Mutationsfrequenzen gegen variable UVA-Dosen bei fixen Angelicin-Konzentrationen (10 (A), 20 (B), 50 (C), 75 (D) µg/ml) und die zugehörigen Linearregressionen mit einem 95%-Konfidenz-Intervall (n=3-6; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01, ### ≤ 0,001)

Auch in den Abbildungen 6.4.1e A-D ist im Rahmen der Standardabweichungen ein ebenfalls linearer Anstieg in der Auftragung Mutationsfrequenz gegen UVA-Dosis bei allen vier verschiedenen fixen Angelicin-Konzentrationen zu erkennen, welche sich wiederum nur in der Steigung ihrer Regressionsgeraden unterscheiden, die von $0,30 \pm 0,04$ Kolonien*mJ⁻¹*cm² (10 µg/ml) bis $1,00 \pm 0,12$ Kolonien*mJ⁻¹*cm² (75 µg/ml) in Abhängigkeit von der Angelicin-Konzentration ansteigen, was Tab. 6.4.1e zusammenfasst:

Tab. 6.4.1e: Steigung der Linearregressionen der Auftragungen MF gegen UVA-Dosis bei verschiedenen Angelicin-Konzentrationen

Angelicin-Konzentration / µg/ml	Steigung Linearregression / Kolonien*mJ ⁻¹ *cm ²
10	$0,30 \pm 0,04$
20	$0,46 \pm 0,04$
50	$0,92 \pm 0,05$
75	$1,00 \pm 0,12$

Analog zu Abb. 6.4.1c ergibt sich in Abb. 6.4.1f ebenfalls ein linearer Zusammenhang in der Auftragung der in Tab. 6.4.1a ermittelten Steigungen der Linearregressionen gegen die UVA-Dosis:

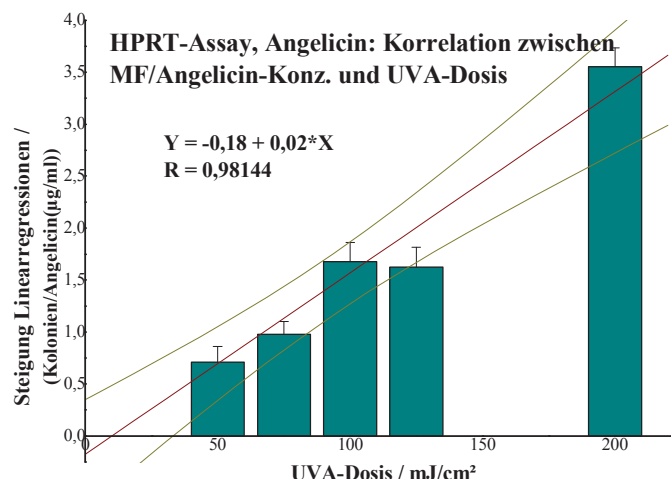


Abb. 6.4.1f: Abhängigkeit der Steigungen der Linearregressionen [Kolonien / µg/ml Angelicin] der Auftragungen MF gegen Angelicin-Konz. bei unterschiedlichen UVA-Dosen aus Abb. 6.4.1d A-E von der UVA-Dosis (n=3-6; Fehlerbalken = Fehler Linearregressionen) und die zugehörigen Linearregressionen mit einem 95%-Konfidenz-Intervall

In dieser Auftragung zeigt Angelicin erwartungsgemäß wie bei den Proportionalitätsfaktoren auch hier einen höchstwahrscheinlich UVA-dosis- und konzentrationsunabhängigen Unterschied in der Steigung der Linearregression und somit der photomutagenen Potenz von einem Faktor ≈ 30 zu 5-MOP (Angelicin: $0,0175 \text{ Kol} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^2 / \mu\text{g} \cdot \text{mJ}$ vs. 5-MOP: $0,4813 \text{ Kol} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^2 / \mu\text{g} \cdot \text{mJ}$).

6.4.2 Photo-HPRT-Assay: Ergebnisse aller Reinsubstanzen

Wie bereits unter 6.4.1 gezeigt, ist die photomutagene Potenz von Furocumarinen, die in diesem Kapitel für einige FCs ermittelt und verglichen werden soll, UVA-Dosis-unabhängig. Daher wurde die Standard-UVA-Dosis auf 125 mJ/cm^2 festgelegt, wodurch die Steigungen der Regressionsgeraden der konzentrationsabhängigen Mutationsfrequenz-Erhöhung der einzelnen FCs direkt miteinander verglichen werden können. In Tab. 6.4.2 sind die Steigungen der ermittelten Regressionsgeraden der einzelnen Furocumarine aufgeführt, die zugehörigen Graphen befinden sich im Anhang. Über diese Steigungen können nun die Photomutagenitäts-Äquivalenzfaktoren (Photomutagenicity equivalency factors, PMEFs) im Vergleich zum potentesten Furocumarin, 5-MOP, berechnet werden nach:

$$PMEF_{\text{Furocumarin}} = \frac{\text{Steigung}_{\text{Furocumarin}}}{\text{Steigung}_{5\text{-MOP}}}$$

Zusätzlich werden die D_{3C} - und D_{10C} -Werte berechnet nach (vgl. 5.3.2):

$$D_{3\text{ bzw. }10C} = \frac{3\text{ bzw. }10 * MF_0 * K}{MF}$$

Mit: $D_{3\text{ bzw. }10C}$ = Substanz-Konzentration, die eine Erhöhung der MF auf das 3- bzw. 10-fache der MF_0 bewirkt

MF = Mutationsfrequenz (Mutanten / 10^6 Zellen)

MF_0 = spontane Mutationsfrequenz

K = Konzentration der Testsubstanz

Tab. 6.4.2: Steigungen der Linearregressionen (Mutationsfrequenz als Funktion der Furocumarinkonzentration) und die daraus berechneten PMEFs und $D_{3,10C}$ -Werte im HPRT-Assay aller getesteten Furocumarine nach Bestrahlung mit 125 mJ/cm²

Substanz	Steigung Linear- regression	PMEF	PMEF _{μM}	D _{3C} / μg/ml	D _{10C} / μg/ml	D _{10C,μM} / μM
5-MOP	49,22 ± 3,63	1 ± 0,074	1 ± 0,074	0,4	2,0	9,1
8-MOP	11,79 ± 0,77	0,240 ± 0,016	0,240 ± 0,016	2,4	8,9	41,1
Angelicin	1,62 ± 0,19	0,033 ± 0,004	0,028 ± 0,003	5,0	52,358	281,2
Bergamottin*	0,25 ± 0,04	0,005 ± 0,001	0,008 ± 0,001	75,2	(377,9)	(1116,6)
Bergaptol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Byakangelicin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6',7'-Dihydroxy- bergamottin	1,67 ± 0,22	0,034 ± 0,005	0,058 ± 0,008	13,8	(59,9)	(160,8)
Epoxybergamottin	1,62 ± 0,34	0,033 ± 0,007	0,054 ± 0,011	15,0	(62,4)	(176,1)
Heraclenin	2,33 ± 0,13	0,047 ± 0,003	0,063 ± 0,003	11,0	43,9	153,5
Imperatorin	4,92 ± 0,24	0,100 ± 0,005	0,125 ± 0,006	4,9	20,5	76,0
Isobergapten	Kein linearer Verlauf, daher keine Linearregression möglich					
Isoimperatorin	0,37 ± 0,05	0,008 ± 0,001	0,009 ± 0,001	54,5	(264,0)	(976,9)
Isopimpinellin*	0,13 ± 0,02	0,003 ± 0,001	0,003 ± 0,010	(219,7)	(798,3)	(3242,1)
Khellin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Limettin	1,14 ± 0,07	0,023 ± 0,001	0,022 ± 0,001	21,2	88,7	430,1
Oxypeucedanin	2,88 ± 0,66	0,059 ± 0,013	0,078 ± 0,018	7,8	(34,4)	(120,3)
Oxypeucedanin- hydrat	2,38 ± 0,20	0,048 ± 0,004	0,068 ± 0,006	9,8	(42,0)	(138,1)
Pimpinellin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phellopterin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Psoralen*	15,73 ± 2,28	0,320 ± 0,046	0,275 ± 0,040	0,5	5,4	29,0
Sphondin	4,35 ± 0,63	0,088 ± 0,013	0,088 ± 0,013	5,6	23,3	107,5
Xanthotoxol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*Literaturdaten, berechnet aus (Lohr 2009, Lohr et al. 2010); n.d. = nicht detektierbar; Werte in Klammern (): In dieser Konzentration nicht löslich oder zytotoxisch, so dass die Erhöhung der MF auf $10 * MF_0$ nur theoretischer Natur ist

Wie schon in Abb. 6.4 dargestellt, zeigen alle Furocumarine, Limettin und Khellin ohne Lichteinfluss keine mutagenen Effekte. Nach der Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht sind allerdings sehr wohl photomutagene Effekte zu beobachten, die in ihrer Ausprägung substanzabhängig stark variieren. So können innerhalb ihrer Löslichkeitsgrenzen für

Bergaptol, Byakangelicin, Khellin, Pimpinellin, Phellopterin und Xanthotoxol keine photomutagenen Eigenschaften festgestellt werden; dies trifft im Prinzip auch auf Isopimpinellin zu, da nach Bradley et al. (1981) eine Substanz als mutagen eingestuft werden kann, wenn die induzierte Mutationsfrequenz dreimal höher als MF_0 ist. Die dafür benötigte Isopimpinellin-Konzentration ist aufgrund der geringeren Löslichkeit theoretischer Natur (Lohr et al. 2010). Für alle anderen Furocumarine liegen die Konzentrationen, die für eine Erhöhung der MF auf das Dreifache von MF_0 benötigt werden, innerhalb deren Löslichkeitsgrenzen, wobei diese für Isobergapten aufgrund einer nicht linearen DRC nur auf 7-8 $\mu\text{g/ml}$ geschätzt werden kann. Der wahrscheinlichste Grund für diesen Verlauf ist das Ausfallen der zuvor gelösten Substanz aus der Lösung, was durch das Arbeiten unter Lichtausschluss nicht bemerkbar war.

Die von Bradley et al. (1981) beschriebene „mutagenic potency“ D_{10C} konnte weiterhin für einige FCs nicht zuverlässig bestimmt werden, da die erforderliche theoretische Konzentration entweder oberhalb der jeweiligen Löslichkeitsgrenze lag (Bergamottin, Isoimperatorin) oder die Phototoxizität in diesem Dosisbereich für die Ausbildung von Mutanten zu stark ausgeprägt war (6',7'-Dihydroxybergamottin, Epoxybergamottin, Oxypeucedanin, Oxypeucedaninhydrat).

Für die getesteten photomutagenen Furocumarine ergibt sich bezüglich ihres photomutagenen Potentials (PMEF) folgende Reihenfolge, wobei die Einordnung von Isobergapten aufgrund der nichtlinearen DRC nicht möglich ist:

5-MOP > Psoralen > 8-MOP > Imperatorin > Sphondin > Oxypeucedanin > Oxypeucedaninhydrat \approx Heraclenin > 6',7'-Dihydroxybergamottin \approx Angelicin \approx Epoxybergamottin > Limettin > Isoimperatorin \approx Bergamottin \approx Isopimpinellin.

Diese ändert sich bei der Einstufung über $PMEF_{\mu\text{M}}$ nur geringfügig zu:

5-MOP > Psoralen > 8-MOP > Imperatorin > Sphondin > Oxypeucedanin > Oxypeucedaninhydrat > Heraclenin > 6',7'-Dihydroxybergamottin > Epoxybergamottin > Angelicin > Limettin > Isoimperatorin \approx Bergamottin > Isopimpinellin.

Auf die möglichen Ursachen und Bewertung dieser Ergebnisse wird ausführlich in der Diskussion (Kap. 7) eingegangen.

6.4.3 Photo-HPRT-Assay: Ergebnisse der Furocumarin-Mischungen

Alle Mischungen aus Tab. 6.1 wurden zur Charakterisierung des photomutagenen Potentials von Furocumarinen in Mischungen herangezogen und die Daten isobolographisch, über CI-Werte und das PMEF-Konzept verglichen.

6.4.3.1 Isobolographische Analyse

In Abb. 6.4.3.1 A-C sind die Daten der Photo-HPRT-Tests der mit 125 mJ/cm^2 UVA-Licht bestrahlten Inkubationen 5-MOP, 8-MOP, Mix 1, 5 und 6 als Isobologramme dargestellt. Als zu vergleichende Effekte wurde die Induktion von Mutationsfrequenzen von 50 (A), 75 (B) und 100 (C) $\cdot 10^{-6}$ gewählt.

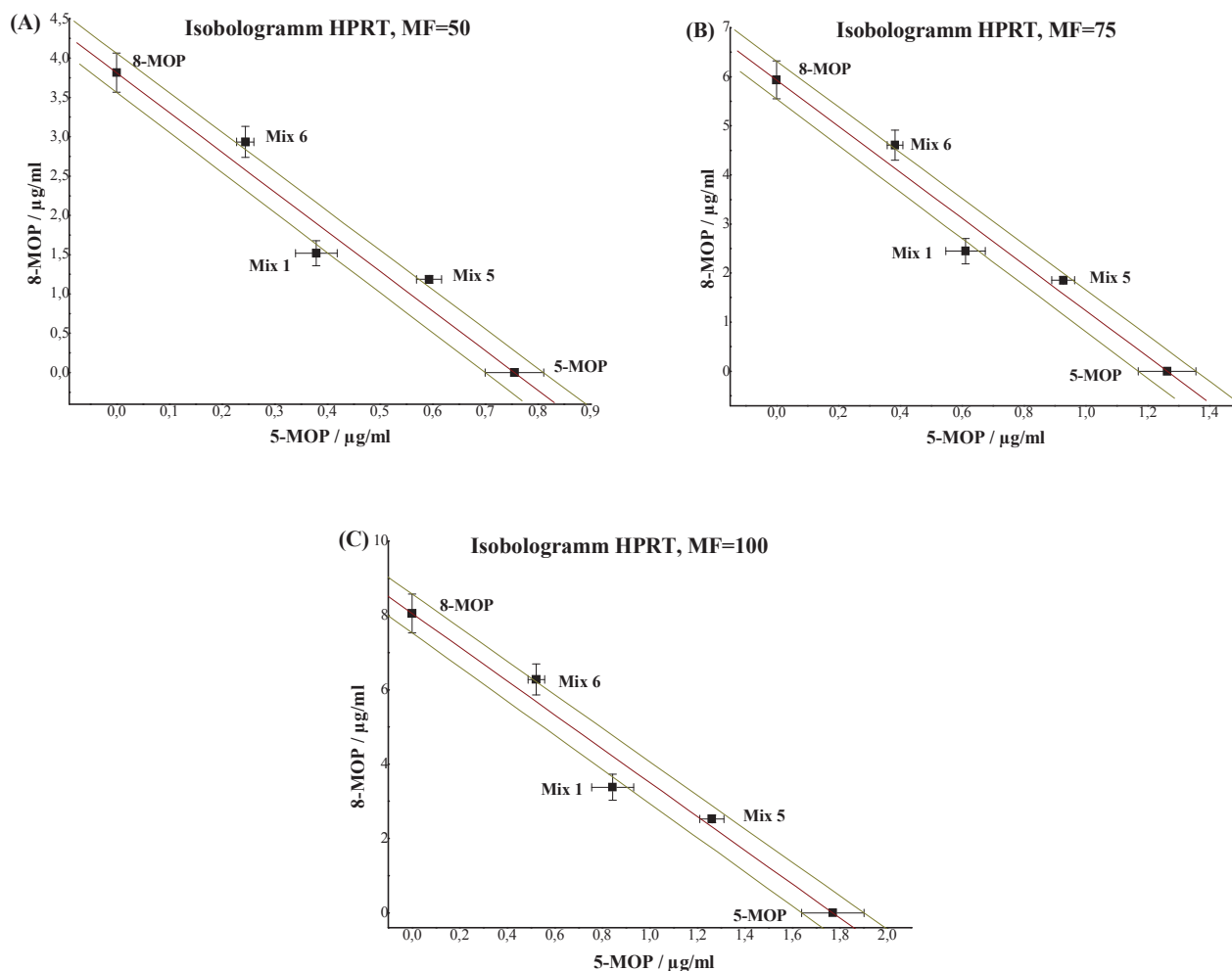


Abb. 6.4.3.1 A-C: Isobologramme von 5-MOP und 8-MOP im Photo-HPRT-Assay. Dargestellt ist 8-MOP als Funktion von 5-MOP, als zu betrachtende Effekte wurden die Mutationsfrequenzen (MF) 50 (A), 75 (B) und 100 (C) 10^{-6} gewählt. Zugrundeliegende Daten sind die Linearregressionen der mit 125 mJ/cm^2 UVA-Licht bestrahlten Inkubationen mit den Reinstoffen 5-MOP, 8-MOP und deren Mischungen Mix 1, Mix 5 und Mix 6 (vgl. Tab. 6.1), die angegebenen Fehler wurden aus den Fehlern der Linearregressionen berechnet (5-MOP $n=4$, 8-MOP $n=4$, Mix1 $n=4$, Mix5 $n=8$, Mix6 $n=6$)

Die in Abb. 6.4.3.1 A-C dargestellten weinroten Geraden sind die Isobolen der Konzentrationen der beiden Reinsubstanzen 5-MOP und 8-MOP, die jeweils für sich alleine eine Erhöhung der Mutationsfrequenz auf 50 (A), 75 (B) und 100 (C) $\cdot 10^{-6}$ in Kombination mit einer UVA-Dosis von 125 mJ/cm^2 bewirken. Unter der Annahme, dass das Konzept der Dosis-Additivität auch hier anwendbar ist, sollten alle beliebigen Kombinationen von 5-MOP und 8-MOP, die den gleichen Effekt bewirken, auf dieser Iso-Effekt-Linie liegen. In der Tat trifft dies für alle getesteten Kombinationen bei allen betrachteten Effekten innerhalb der Fehlergrenzen der zugrundeliegenden Regressionsgeraden zu. Aufgrund der Verteilung der geringen Schwankungen ober- und unterhalb der Isobolen kann auch nicht auf eventuelle konkave oder konvexe Veränderungen der Linie geschlossen werden, weshalb antagonistische oder synergistische Wechselwirkungen in Mischungen von 5-MOP und 8-MOP praktisch ausgeschlossen werden können.

6.4.3.2 Vergleich über Interaktions-Index CI

In Tab. 6.4.3.2 finden sich die nach $CI = \sum_{i=1}^n d_i / D_i$ berechneten Interaktions-Indizes CI für verschiedene Mutationsfrequenzen von 40 bis $100 \cdot 10^{-6}$ aller im Photo-HPRT-Assay getesteten FC-Mischungen:

Tab. 6.4.3.2: CIs für verschiedene Mutationsfrequenzen der getesteten FC-Mischungen

Substanz	CI MF = 40	CI MF = 50	CI MF = 60	CI MF = 75	CI MF = 100
5-MOP	1,000 ± 0,074	1,000 ± 0,074	1,000 ± 0,074	1,000 ± 0,074	1,000 ± 0,074
Mix 1	0,905 ± 0,095	0,900 ± 0,094	0,898 ± 0,094	0,897 ± 0,094	0,896 ± 0,094
Mix 2	1,164 ± 0,077 [#]	1,129 ± 0,075	1,108 ± 0,074	1,090 ± 0,072	1,073 ± 0,071
Mix 3	0,907 ± 0,019	0,842 ± 0,018 [#]	0,818 ± 0,017 [#]	0,803 ± 0,017 [#]	0,793 ± 0,017 [#]
Mix 4	1,161 ± 0,122	1,073 ± 0,112	1,036 ± 0,108	1,010 ± 0,106	0,990 ± 0,104
Mix 5	1,152 ± 0,046 [#]	1,106 ± 0,045	1,080 ± 0,044	1,056 ± 0,043	1,035 ± 0,042
Mix 6	1,105 ± 0,074	1,093 ± 0,073	1,086 ± 0,072	1,080 ± 0,072	1,075 ± 0,072
Mix 7	0,732 ± 0,108 ^{##}	0,739 ± 0,109 [#]	0,743 ± 0,109 [#]	0,747 ± 0,110 [#]	0,750 ± 0,110 [#]
Mix 8	0,915 ± 0,178	0,889 ± 0,173	0,874 ± 0,170	0,860 ± 0,167	0,848 ± 0,165
Angelika	1,136 ± 0,188	1,115 ± 0,184	1,103 ± 0,182	1,093 ± 0,181	1,083 ± 0,179

Statistische Behandlung: Mischung vs. 5-MOP: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01)

Unter der Annahme strikt additiven Verhaltens sollten die berechneten CIs gleich 1 sein. Dies trifft innerhalb der Fehlergrenzen für alle betrachteten Effekte (Mutationsfrequenzen zwischen 40 und $100 \cdot 10^{-6}$) für die Mischungen 1, 2, 4-6, 8 und Angelika zu; hier konnten keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden. Die CIs von Mix 3 weichen jedoch signifikant unter 1, die von Mix 7 signifikant über 1 ab. Warum die Werte von Mix 3 (10 µg/ml Imperatorin, 30 µg/ml Angelicin) von 1 abweichen, kann nicht eindeutig geklärt werden; diese FCs sind in Mix 4 mit ähnlich potenten FCs kombiniert, dessen CIs sich nicht signifikant von 1 unterscheiden. Die Furocumarin-Dosen, die in Mix 7 zu den betrachteten Effekten führen, sind aufgrund der starken Phototoxizität von Oxypeucedanin, Oxypeucedaninhydrat, 6',7'-Dihydroxybergamottin und Epoxybergamottin allerdings theoretischer Natur, weshalb Fehler bei der Dosisermittlung durch die große Extrapolation zustande gekommen sein könnten. Somit kann kein allgemeiner Trend für Furocumarin-Mischungen bezüglich antagonistischer oder synergistischer Mischungseffekte über den Interaktions-Index CI beobachtet werden.

6.4.3.3 Vergleich über PMEF-Konzept

Die Abbildungen 6.4.3.3a A-I zeigen die Auftragungen der Mutationsfrequenz MF der einzelnen Mischungen gegen die hypothetischen PMEQ-Konzentrationen in µg/ml. Berechnet wurden diese aus den in Tab. 6.4.2 bestimmten PMEFs nach

$$PMEQ[\mu\text{g} / \text{ml}] = \sum_{i=1}^n PMEF_i \times \text{Konz.}_i[\mu\text{g} / \text{ml}].$$

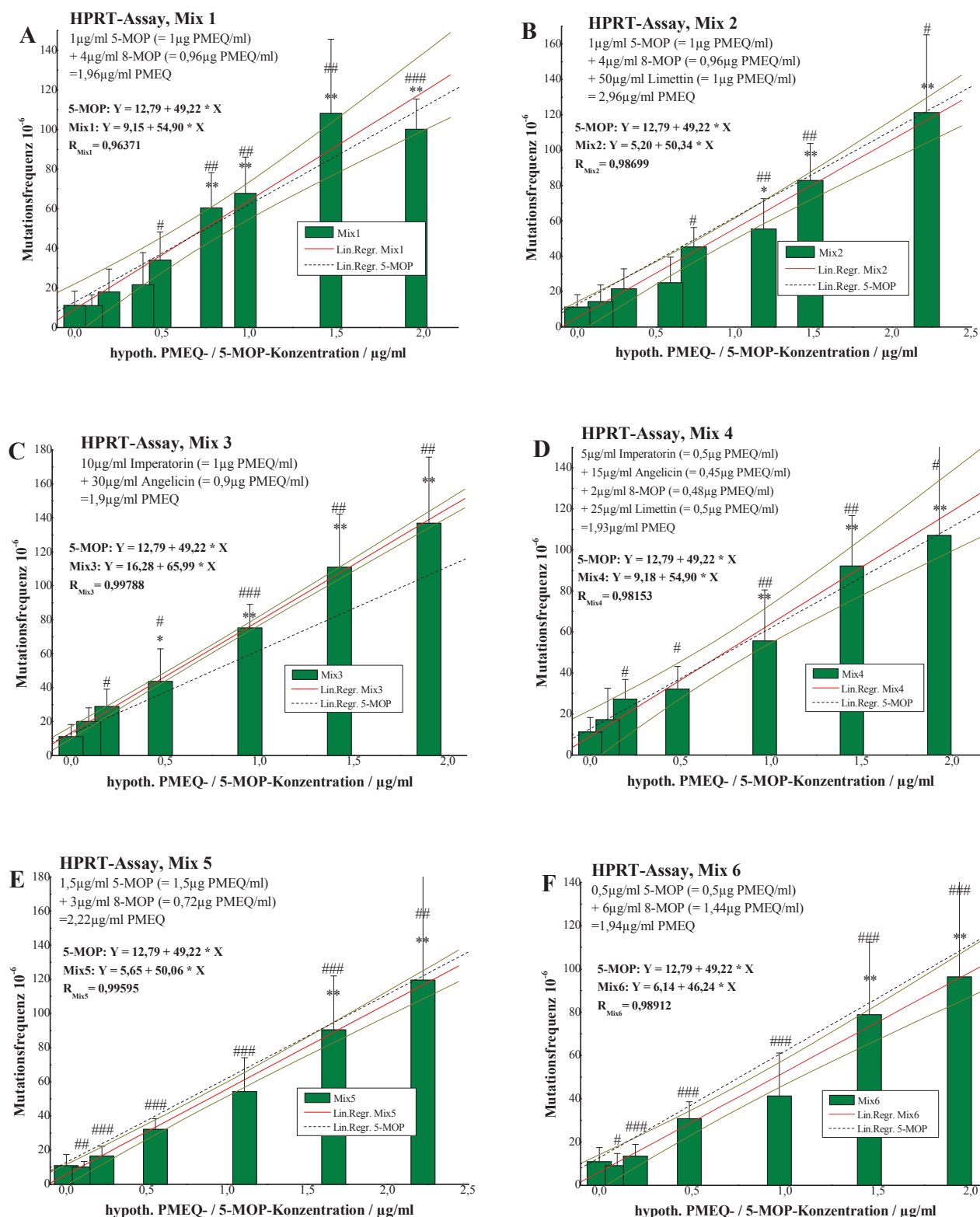


Abb. 6.4.3.3a A-f: HPRT-Assay zur Erfassung photogentoxischer Effekte der Furocumarinmischungen aus Tab. 6.1. Dargestellt sind die Auftragungen der Mutationsfrequenzen gegen variable PME-Q-Konzentrationen nach Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht, die zugehörigen Linearregressionen (rot) mit einem 95%-Konfidenz-Intervall (dunkelgelb) und zum Vergleich die Gerade von 5-MOP (schwarz gestrichelt); dunkelgrüne Balken: wegen Zytotoxizität nicht berücksichtigte Werte (n=3-8; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way* ANOVA+*Dunnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test*, *Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01, ### ≤ 0,001)

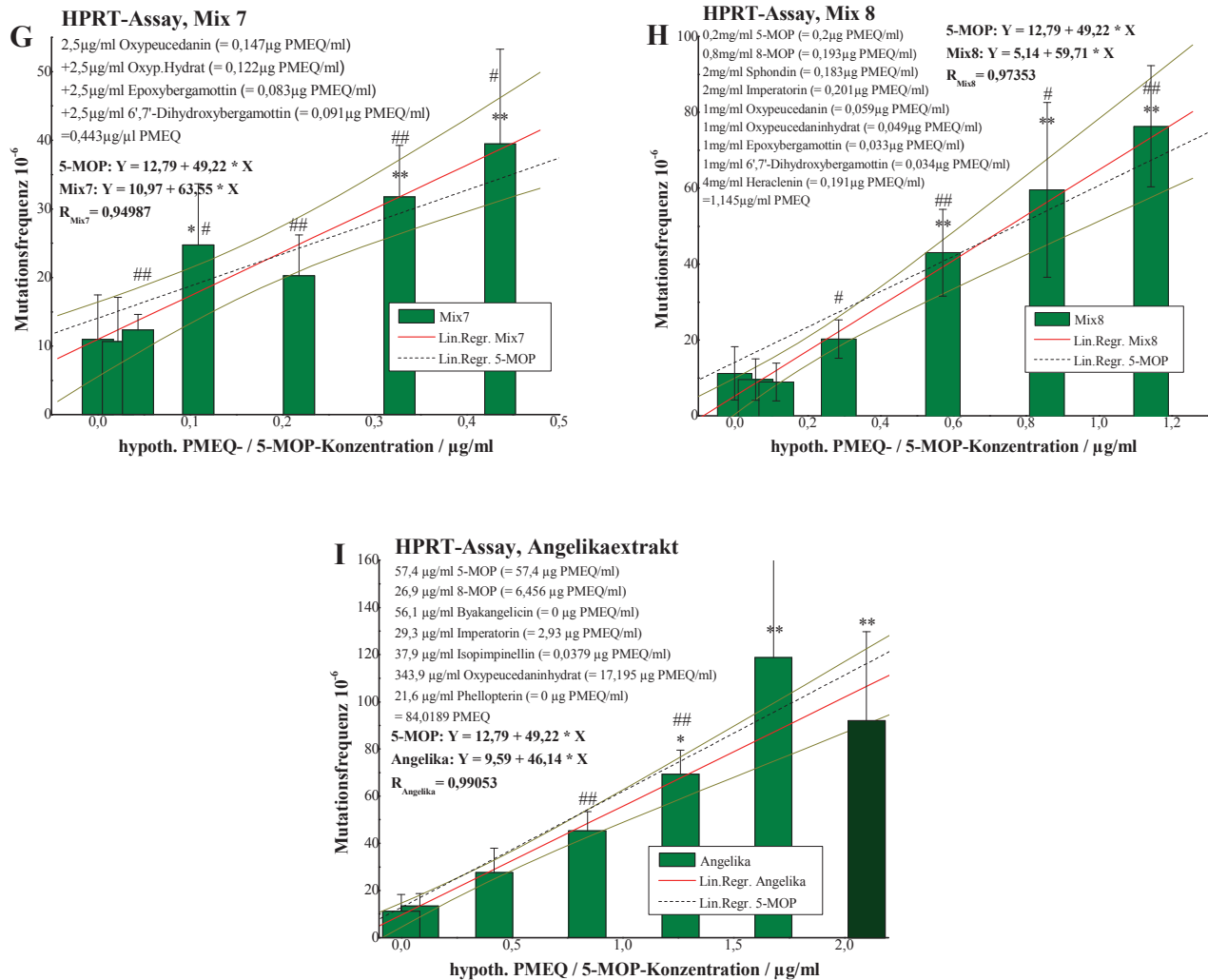


Abb. 6.4.3.3a G-I: HPRT-Assay zur Erfassung photogentoxischer Effekte der Furocumarinmischungen aus Tab. 6.1. Dargestellt sind die Auftragungen der Mutationsfrequenzen gegen variable PQE-Konzentrationen nach Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht, die zugehörigen Linearregressionen (rot) mit einem 95%-Konfidenz-Intervall (dunkelgelb) und zum Vergleich die Gerade von 5-MOP (schwarz gestrichelt); dunkelgrüne Balken: wegen Zytotoxizität nicht berücksichtigte Werte (n=3-8; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA*+*Dunnnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test*, *Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01, ### ≤ 0,001)

Bei Anwendbarkeit des PQEF-Konzepts sollten die Regressionsgeraden der Auftragungen Mutationsfrequenz gegen die PQEs der Mischungen deckungsgleich mit der Regressionsgeraden von 5-MOP sein. Diese liegt bei Mix 1, 4 & 7 vollständig im 95 % Konfidenzintervall der Mischungen, bei Mix 2, 8 und dem Angelikaextrakt nahezu vollständig und bei Mix 5 und 6 marginal darüber, was auch durch das verhältnismäßig schmale Konfidenzintervall zu erklären ist. Bezieht man das 95 % Konfidenzintervall von 5-MOP in diese Betrachtung mit ein (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt), stimmen die Regressionsgeraden der Mischungen 1, 2, 4-8 und der Angelikaextrakt mit der von 5-MOP überein. Nur die Regressionsgerade von Mix 3 stimmt nicht mit der von 5-MOP überein, was wie schon unter 6.4.3.2 erläutert, nicht erklärbar ist.

Eine Übersicht über die Steigungen der einzelnen Linearregressionen und ihre Abweichungen gibt Tab. 6.4.3.3:

Tab. 6.4.3.3: Steigungen der Linearregressionen aus Abb. 6.4.3.3 A-I und Abweichungen von 5-MOP

Mischung	Steigung Linearregression / Kolonien* μg^{-1} *ml	Abweichung von 5-MOP	Signifikanz*
5-MOP	49,22 \pm 3,63	0 %	n.s.
Mix 1	54,90 \pm 5,75	11,54 %	n.s.
Mix 2	50,34 \pm 3,35	2,27 %	n.s.
Mix 3	66,02 \pm 1,93	34,13 %	##
Mix 4	49,26 \pm 3,63	0,07 %	n.s.
Mix 5	50,06 \pm 2,02	1,69 %	n.s.
Mix 6	46,24 \pm 3,08	-6,06 %	n.s.
Mix 7	63,55 \pm 9,36	29,10 %	n.s.
Mix 8	59,71 \pm 11,61	21,30 %	n.s.
Angelika	46,14 \pm 7,62	-6,26 %	n.s.

*Statistische Behandlung: Mischung vs. 5-MOP: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, n.s. = nicht signifikant, ## $\leq 0,01$)

In Übereinstimmung mit den graphischen Betrachtungen ist in Tab. 6.4.3.3 zu sehen, dass nur die Steigung der Linearregression von Mix 3 sehr signifikant von der von 5-MOP abweicht. Daher kann geschlossen werden, dass das PMEF-Konzept prinzipiell auf alle Furocumarine und Limettin anwendbar ist. Da es sich hierbei um lineare Dosis-Wirkungs-Beziehungen handelt, kann hier noch nicht geklärt werden, ob sich FC-Mischungen im Photo-HPRT-Assay dosisadditiv oder effektadditiv verhalten, da beide Konzepte bei einer linearen DRC gleiche Ergebnisse zeigen (Cassee et al. 1998, Marquardt and Schäfer 2004). Somit ist die Art der Additivität prinzipiell für die Anwendbarkeit des PMEF-Konzepts unerheblich.

Trägt man nach Cassee (1998) und Pösch (1980 & 1990) analog zu Abb. 6.3.2.2a die Mutationsfrequenz gegen eine variable, nicht-logarithmische 5-MOP-Konzentration auf, wobei jeweils fixe Konzentrationen 8-MOP (0, 1, 2, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt wurden, ergibt sich folgendes Bild (Abb. 6.4.3.3b):

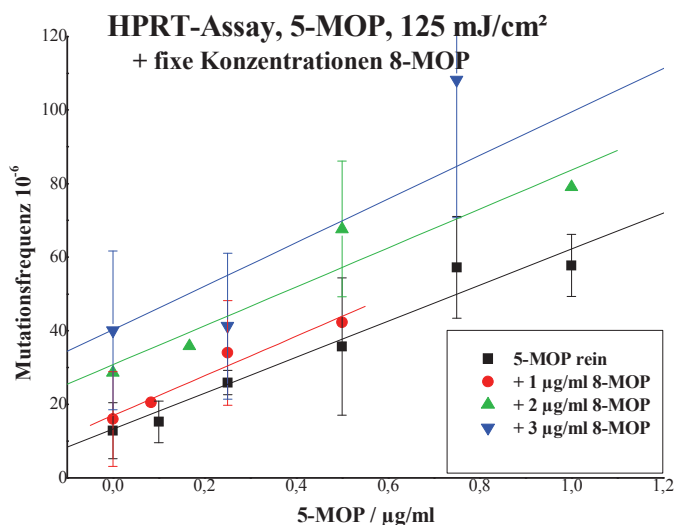


Abb. 6.4.3.3b: Photo-HPRT-Assay, Auftragung Mutationsfrequenz gegen variable 5-MOP-Konzentrationen mit Zusatz von 0, 1, 2 oder 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 8-MOP mit dazugehörigen Regressionsgeraden

Abb. 6.4.3.3b zeigt eine Parallelverschiebung der Regressionsgeraden der Auftragung MF gegen 5-MOP-Konzentration mit zunehmender 8-MOP-Konzentration. Es ist also prinzipiell nicht auszumachen, ob es sich dabei um eine Verschiebung der DRC in Richtung Systemantwort, also einer Erhöhung der Mutationsfrequenz handelt, oder eine negative Verschiebung Richtung 5-MOP-Konzentration. Da allerdings alle Geraden absolut parallel verlaufen, was bei Dosis-Additivität mit einer Verschiebung entlang der x-Achse der Fall ist, nicht aber bei Effekt-Additivität, da hier die Abstände der DRCs mit steigender 5-MOP-Konzentration mit dem kleiner werdenden Einzeleffekt der 8-MOP-Konzentration im Verhältnis zu 5-MOP im Gesamteffekt ebenfalls kleiner werden und somit die Geraden mit steigender 5-MOP-Konz. zusammenlaufen müssten, kann also auf Dosis-Additivität geschlossen werden. Diese würde durch die Ergebnisse aus der Phototoxizitätsprüfung und der Korrelation der MF mit der DNA-Adduktbildung, also des gleichen Targets von 5-MOP und 8-MOP, bestätigt werden (Cassee et al. 1998, Marquardt and Schäfer 2004, Pöch et al. 1990, Pöch and Holzmann 1980).

6.5 Photo-Mikrokern-Test (MNA)

Analog zu Kapitel 6.4 werden hier Furocumarine, Limettin, Khellin und ihre Mischungen Mix 1,2, 5-8 hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Mikrokerninduktion untersucht.

Auch hier sind unter Lichtausschluss keine oder nur sehr geringfügige clastogene Effekte zu erwarten, weshalb auch hier die zur Kontrolle mitgeführten unbestrahlten Proben nur in der höchsten verwendeten Furocumarin-Konzentration getestet wurden. Bei den weiteren Kontrollen handelt es sich um die allgemeinen Negativkontrollen, reines Inkubationsmedium und 0,5% DMSO, sowohl unbestrahlt als auch mit 125 mJ/cm² UVA-Licht bestrahlt und die Positivkontrolle Mitomycin C (MMC, 0,1 µg/ml), die sich in Vorversuchen als am besten geeignet erwies. Dargestellt sind diese in Abb. 6.5.1:

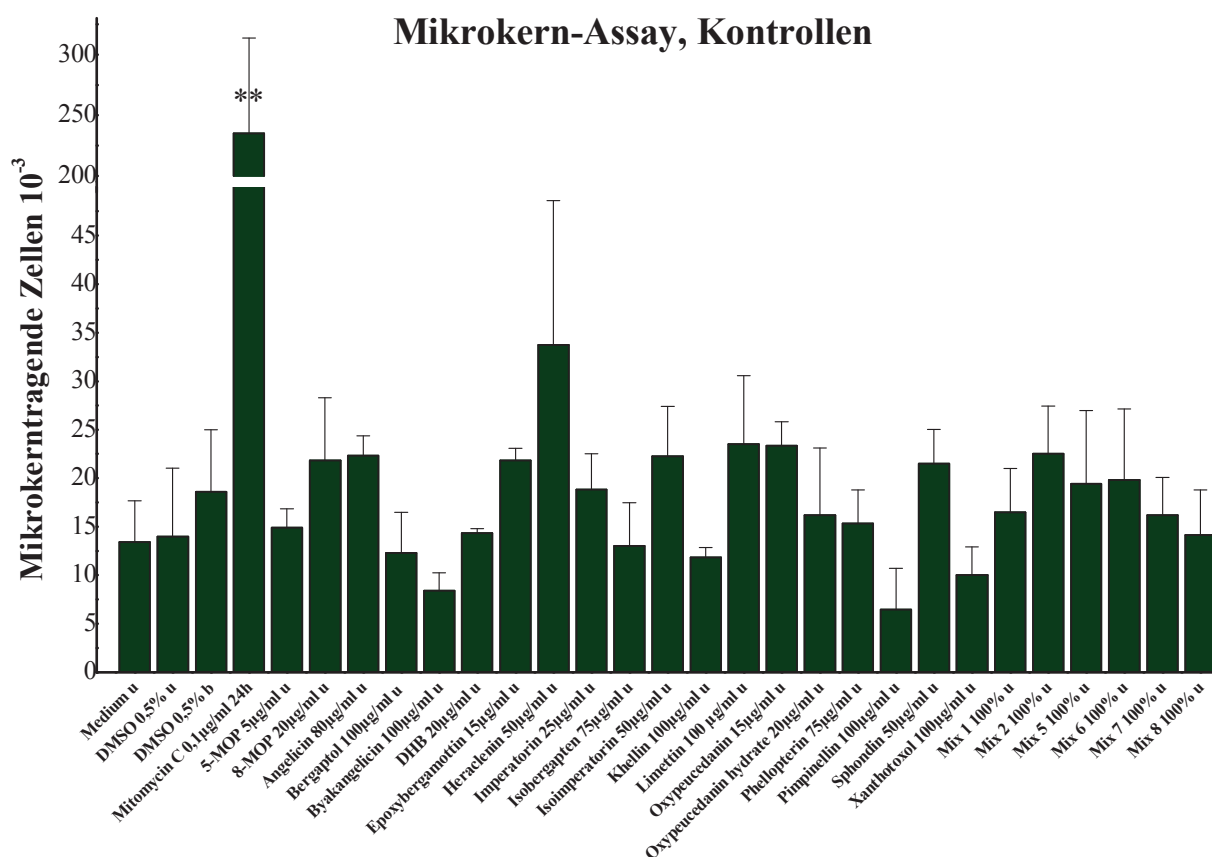


Abb. 6.5: Im MN-Assay verwendete Kontrollen: Als Positivkontrolle diente Mitomycin C 0,1µg/ml, als Negativkontrollen dienen das reine Medium und das Lösemittel DMSO 0,5%, sowohl unbestrahlt (u) als auch mit 125 mJ/cm² UVA-Licht bestrahlt (b), und die unbestrahlten, höchsten eingesetzten Konzentrationen aller (Furo-)cumarine und deren Mischungen (n=3-9; p-value: DMSO u vs. Behandlung: *one-way* ANOVA+*Dunnnett's post test*, ** ≤ 0,01)

In Abb. 6.5 zeigt sich, dass zwar bei allen Negativkontrollen nicht unübliche Schwankungen auftreten, die Zahl der mikrokerntragenden Zellen (MNZ) pro 1000 sich

aber nicht signifikant von der unbestrahlten Lösemittelkontrolle ($14 \pm 7 \text{ MNZ} \cdot 10^{-3}$) unterscheidet. Zwar liegt die mit 125 mJ/cm^2 bestrahlte DMSO-Kontrolle etwas höher ($16,6 \pm 6,4 \text{ MNZ} \cdot 10^{-3}$), aber dennoch im Bereich der Schwankungsbreite aller Negativkontrollen; Kersten et al. (1999) zeigten eine ähnliche Größenordnung und Schwankungsintensität ihrer unbehandelten V79-Zellen ($10,3 \pm 6,6 \text{ MNZ} \cdot 10^{-3}$). Somit ist gezeigt, dass wie gefordert weder die UVA-Dosis von 125 mJ/cm^2 als auch die Inkubation mit Furocumarinen unter Lichtausschluss keinen deutlichen Einfluss auf die spontane Mikrokernrate hat. Die Positivkontrolle Mitomycin C ($0,1 \text{ µg/ml}$) unterscheidet sich mit $235 \pm 78,8 \text{ MNZ} \cdot 10^{-3}$ sehr signifikant von der Lösemittelkontrolle, weshalb auch dieser Assay als valide betrachtet werden kann.

6.5.1 Photo-Mikrokern-Test: Zusammenhang Furocumarin-Konzentration / UVA-Dosis

Hier wird am Beispiel von 5-MOP, einem bifunktionalen, weitverbreiteten und im Rahmen dieser Arbeit potentesten Furocumarin, zunächst detailliert der Zusammenhang zwischen Konzentration und UVA-Dosis untersucht. Eine analoge Testung von Angelicin, einem monofunktionalen FC, ist wie im HPRT-Assay nicht sinnvoll, da dieses im MNA deutlich weniger potent als im HPRT-Assay ist und somit die Ergebnisse für eine sinnvolle Auswertung zu schwankungsintensiv wären (vgl. 6.5.2).

Analog zum HPRT-Assay wurden zunächst mit variablen 5-MOP-Konzentrationen inkubierte V79-Zellen in fünf verschiedenen Versuchsreihen mit fixen UVA-Dosen von $50 - 200 \text{ mJ/cm}^2$ bestrahlt und die ermittelte Anzahl mikrokerntragender Zellen $\cdot 10^{-3}$ gegen die 5-MOP-Konzentration aufgetragen, wie in Abb. 6.5.1a A-E zu sehen:

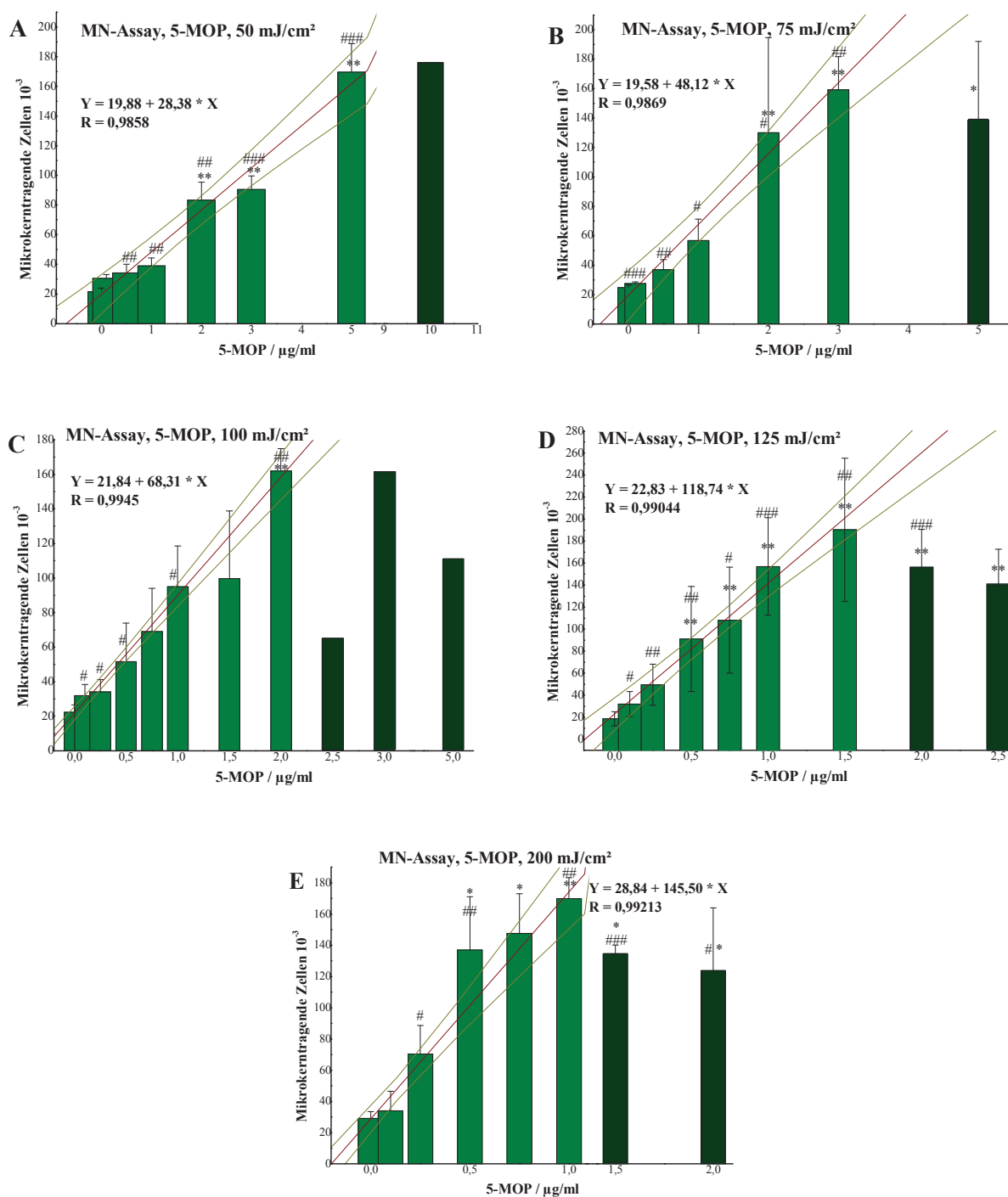


Abb. 6.5.1a A-E: MNA zur Erfassung photogentoxischer Effekte von 5-MOP. Dargestellt sind die Auftragungen der MNZ gegen variable 5-MOP-Konzentrationen bei Bestrahlung mit verschiedenen UVA-Dosen (50 (A), 75 (B), 100 (C), 125 (D), 200 (E) mJ/cm²) und die zugehörigen Linearregressionen mit einem 95%-Konfidenz-Intervall; dunkelgrüne Balken: wegen Zytotoxizität / Zytostatik nicht berücksichtigte Werte (n=4-6; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01, ### ≤ 0,001)

In Abb. 6.5.1a ist zu erkennen, dass bei allen fünf verschiedenen UVA-Dosen (50-200 mJ/cm²) im noch nicht zytotoxischen / zytostatischen Bereich (dunkelgrüne Balken) analog zum HPRT-Assay ein strikt linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der mikrokerntragenden Zellen (MNZ) und der 5-MOP-Konzentration besteht.

Unterschiede zwischen den Strahlungsdosen sind nur in der Steilheit der Regressionsgeraden auszumachen, die von $28,38 \pm 2,16 \text{ MNZ} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{ml}$ (50 mJ/cm^2) bis zu $145,50 \pm 13,02$ (200 mJ/cm^2) $\text{MNZ} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{ml}$ reichen; diese sind in Tab. 6.5.1a aufgelistet. Bei höheren 5-MOP-Konzentrations- und UVA-Dosis-Kombinationen, z.B. $10 \mu\text{g/ml}$ 5-MOP + 50 mJ/cm^2 UVA oder $1,5 \mu\text{g/ml}$ 5-MOP + 200 mJ/cm^2 UVA, ist die Induktion von MNZ wieder rückläufig. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Kersten et al. (1999), die mit 8-Methoxypsoralen in V79-Zellen sowohl bei fixen UVA-Dosen mit steigender 8-MOP-Konzentration als auch fixen 8-MOP-Konzentrationen und steigender UVA-Dosis zunächst einen Anstieg auf ca. 35 % MNZ und mit höheren Konzentrationen bzw. Dosen einen Rückgang auf nahezu die Ausgangswerte fanden. Zurückzuführen ist dies auf zytotoxische / zytostatische Effekte in diesen Konzentrations- / Dosisbereichen, da zur Ausbildung von Mikrokernen DNA-Synthese und / oder Zellteilung stattfinden muss, was während einem Zellzyklus-Arrest nicht möglich ist. Daher werden im Folgenden diese Konzentrations- / UVA-Dosis-Kombinationen zur Ermittlung des photoclastogenen Potentials von Furocumarinen nicht berücksichtigt.

Tab. 6.5.1a: Steigung der Linearregressionen der Auftragungen MNZ gegen 5-MOP-Konzentration bei verschiedenen UVA-Dosen

UVA-Dosis / mJ/cm^2	Steigung Linearregression / $\text{MNZ} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{ml}$
50	$28,38 \pm 2,16$
75	$48,12 \pm 3,93$
100	$68,31 \pm 6,37$
125	$118,75 \pm 7,40$
200	$145,50 \pm 13,02$

In Abb. 6.5.1b ist der 5-MOP-konzentrationsabhängige Verlauf der Mikrokern-Induktion nach einer Bestrahlung mit 125 mJ/cm^2 UVA-Licht noch einmal über repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (DAPI-staining) verdeutlicht. Die grünen Pfeile weisen dabei Mikrokerne aus:

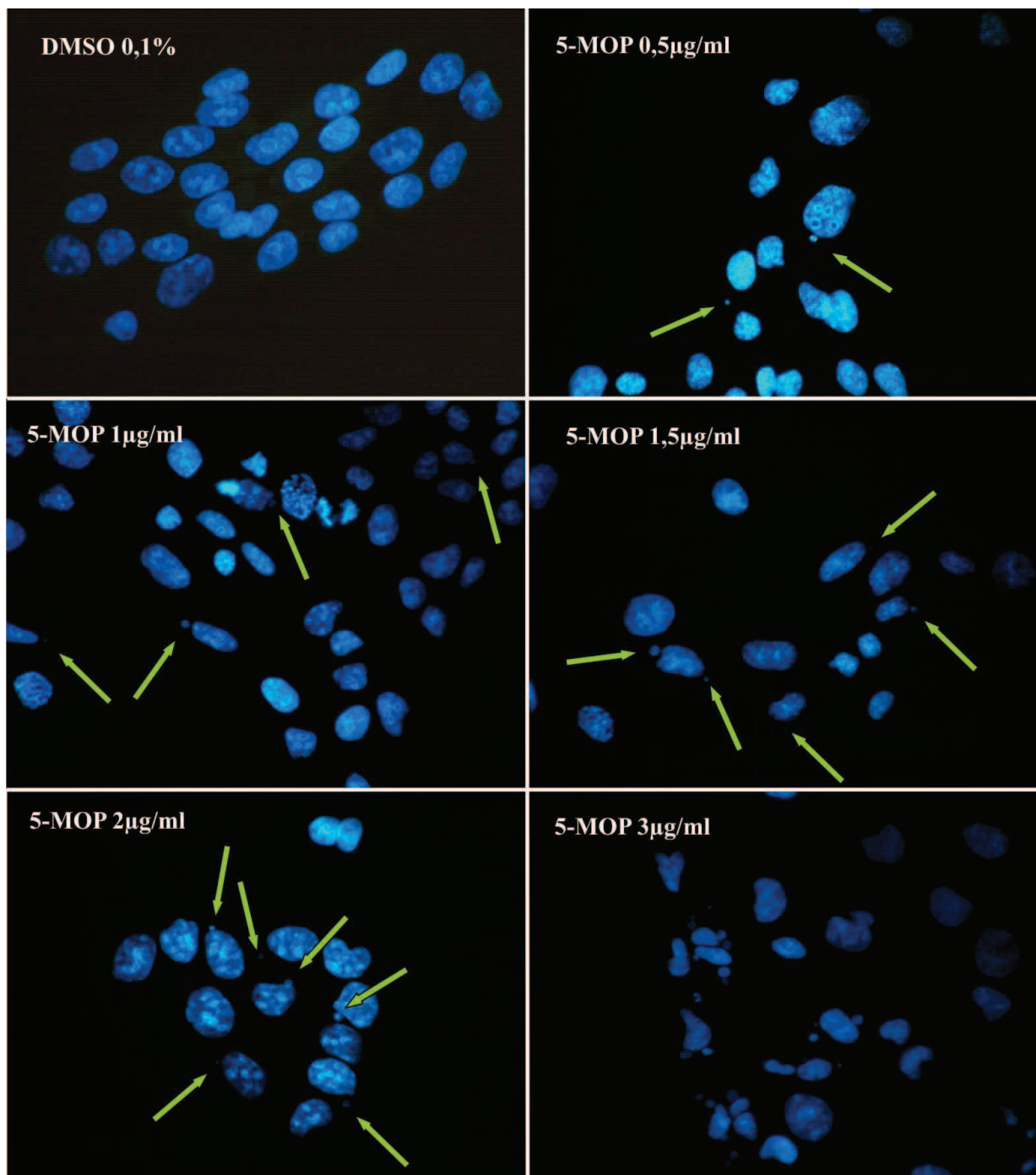


Abb. 6.5.1b: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (DAPI-staining) von mit verschiedenen 5-MOP-Konzentrationen (0-3 µg/ml) inkubierten und mit 125 mJ/cm² UVA-Licht bestrahlten V79-Zellen; Pfeile markieren Mikrokerne, Vergrößerung des Mikroskops: 10 x 60 x 1,25

Während bei der Negativkontrolle nahezu keine Mikrokerne zu sehen sind ($16,6 \pm 6,4 \text{ MNZ} \cdot 10^{-3}$), nimmt die Anzahl der mikrokerntragenden Zellen / 1000 mit steigender 5-MOP-Konzentration zu: 0,5 µg/ml ($91,1 \pm 47,7 \text{ MNZ} \cdot 10^{-3}$), 1 µg/ml ($156,9 \pm 44,3 \text{ MNZ} \cdot 10^{-3}$), 1,5 µg/ml ($190,3 \pm 64,9 \text{ MNZ} \cdot 10^{-3}$), 2 µg/ml ($156,2 \pm 34,4 \text{ MNZ} \cdot 10^{-3}$). Während sich bis zu 2 µg/ml die Hauptkerne fluoreszenzmikroskopisch nicht von der Negativkontrolle unterscheiden, zeigt sich bei 3 µg/ml ($103,5 \text{ MNZ} \cdot 10^{-3}$, n=1) ein anderes Bild: Viele Kerne sind kleiner und / oder in zwei Kerne fragmentiert und es treten häufig mehr als zwei Mikrokerne pro Zelle auf. Diese sollten bei der Bestimmung der Mikrokernelrate nicht berücksichtigt werden, was

neben der Tatsache, dass sich einige Zellkerne überhaupt nicht verändert haben (Arrest), die gesunkene Mikrokernrate erklärt.

In einer alternativen Auftrung, Abb. 6.5.1c A-D, wird bei vier verschiedenen fixen 5-MOP-Konzentrationen (0,5, 0,75, 1, 2 µg/ml) das Auftreten von mikrokerntragenden Zellen in Abhängigkeit von der UVA-Dosis untersucht:

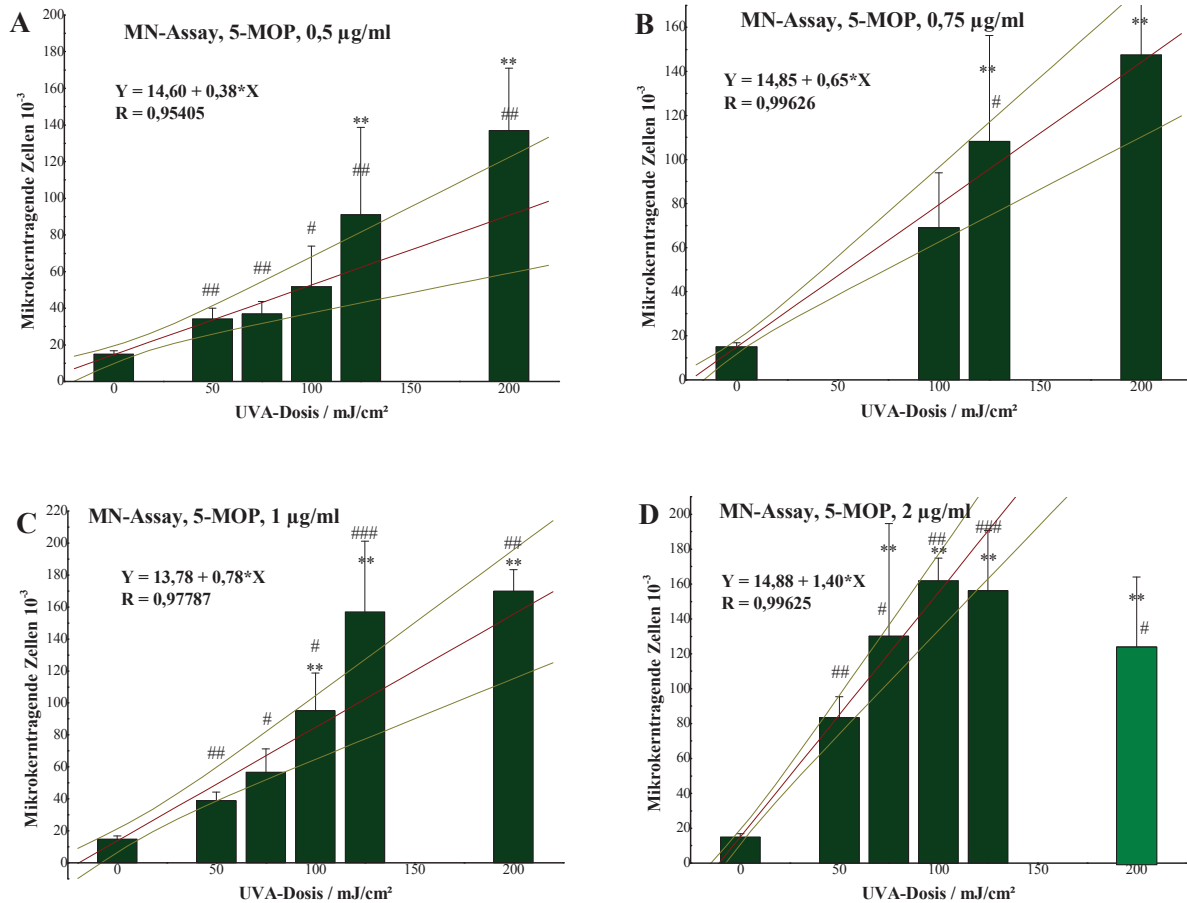


Abb. 6.5.1c A-D: MNA zur Erfassung photogentoxischer Effekte von 5-MOP. Dargestellt sind die Auftrugungen der MNZ gegen variable UVA-Dosen bei fixen 5-MOP-Konzentrationen (0,5 (A), 0,75 (B), 1 (C), 2 (D) µg/ml) und die zugehörigen Linearregressionen mit einem 95%-Konfidenz-Intervall hellgrüner Balken: wegen Zytotoxizität / Zytostatik nicht berücksichtigter Wert (n=4-7; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way* ANOVA+*Dunnnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test*, *Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01, ### ≤ 0,001)

In Abb. 6.5.1c A-D ist im Rahmen der Standardabweichungen ein ebenfalls linearer Anstieg in der Auftrugung mikrokerntragende Zellen $\cdot 10^{-3}$ gegen UVA-Dosis bei allen vier verschiedenen fixen 5-MOP-Konzentrationen bei noch nicht stark zytotoxischen / zytostatischen Kombinationen zu erkennen. Diese unterscheiden sich wiederum nur in der Steigung ihrer Regressionsgeraden, die von $0,18 \pm 0,06 \text{ MNZ} \cdot \text{mJ}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ (0,5 µg/ml) bis $0,95 \pm 0,12 \text{ MNZ} \cdot \text{mJ}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ (2 µg/ml) in Abhängigkeit von der 5-MOP-Konzentration ansteigen, was in Tab. 6.5.1b zusammengefasst ist:

Tab. 6.5.1b: Steigung der Linearregressionen der Auftragungen MNZ gegen UVA-Dosis bei verschiedenen 5-MOP-Konzentrationen

5-MOP-Konzentration / $\mu\text{g/ml}$	Steigung Linearregression / $\text{MNZ} \cdot \text{mJ}^{-1} \cdot \text{cm}^2$
0,5	$0,38 \pm 0,07$
0,75	$0,65 \pm 0,11$
1	$0,71 \pm 0,06$
2	$1,40 \pm 0,11$

Trägt man analog zu Abb. 6.4.1c (HPRT-Assay) die in Tab. 6.5.1a ermittelten Steigungen der Linearregressionen gegen die UVA-Dosis auf, ergeben sich wiederum lineare Zusammenhänge (Abb. 6.5.1d):

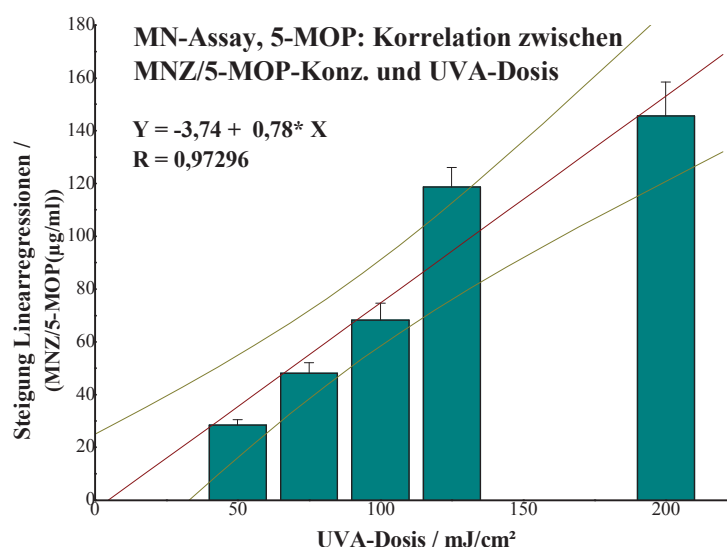


Abb. 6.5.1d: Abhängigkeit der Steigungen der Linearregressionen $[\text{MNZ} \cdot 10^{-3} / \mu\text{g/ml 5-MOP}]$ der Auftragungen MNZ gegen 5-MOP-Konz. bei unterschiedlichen UVA-Dosen aus Abb. 6.5.1a A-E von der UVA-Dosis ($n=4-6$; Fehlerbalken = Fehler Linearregressionen) und die zugehörigen Linearregressionen mit einem 95%-Konfidenz-Intervall

Somit kann analog zum HPRT-Assay die Korrelation zwischen der Erhöhung der Zahl der mikrokerntragenden Zellen $\cdot 10^{-3}$, also der Photoclastogenität, der UVA-Dosis und der 5-MOP-Konzentration unter Einführung eines Proportionalitätsfaktors f wie folgt dargestellt werden:

$$[\text{Photoclastogenität}]_{5\text{-MOP}} = f \cdot [\text{UVA-Dosis}] \cdot [\text{Konz.}]_{5\text{-MOP}}$$

Dies führt zu:

$$f = \frac{\text{Steigung}_{[\text{UVA-Dosis}] = \text{konst.}}}{[\text{UVA-Dosis}]}$$

Der Proportionalitätsfaktor f wurde für diese Daten berechnet und in Tab. 6.5.1c dargestellt:

Tab. 6.5.1c: Steigung der Linearregressionen der Auftragungen MNZ gegen 5-MOP-Konzentration bei verschiedenen UVA-Dosen und dazugehöriger Proportionalitätsfaktor f

UVA-Dosis / mJ/cm ²	Steigung Linearregression / MNZ* μg^{-1} *ml	Proportionalitätsfaktor f / MNZ*cm ² *ml*mJ ⁻¹ * μg^{-1}
50	28,38 \pm 2,16	0,57 \pm 0,04
75	48,12 \pm 3,93	0,64 \pm 0,05
100	68,31 \pm 6,37	0,68 \pm 0,06
125	118,75 \pm 7,40	0,95 \pm 0,06
200	145,50 \pm 13,02	0,73 \pm 0,07

Der Proportionalitätsfaktor f variiert bei den getesteten UVA-Dosen mit Ausnahme von 125 mJ/cm² (0,950 \pm 0,059) zwischen 0,568 \pm 0,043 (50 mJ/cm²) und 0,727 \pm 0,065 (200 mJ/cm²), ist somit ebenfalls relativ stabil über einen großen UVA-Dosis-Bereich und lässt somit keinen eindeutigen UVA-Dosis-abhängigen Effekt erkennen. Der marginale, nicht signifikante Trend zu mit der UVA-Dosis größer werdenden f kann somit zufallsbedingt oder auf eine zeitlich geringfügig verzögerte Ausbildung von Interstrand-Crosslinks zurückzuführen sein, da ihnen die Monoaddukt-Bildung vorausgegangen sein muss und diese sich im MNA stärker bemerkbar machen könnten als im HPRT-Assay (Kersten et al. 2002, Laquerbe, Moustacchi and Papadopoulo 1995). Trotz der geringen Abweichung von f bei 125 mJ/cm² nach oben werden alle folgenden Untersuchungen mit anderen Furocumarinen zur besseren Vergleichbarkeit mit dem Resazurin-Reduktionstest und des HPRT-Assays mit einer Standard-UVA-Dosis von 125 mJ/cm² durchgeführt.

In einem letzten Schritt soll nun noch einmal die synergistische Wechselwirkung zwischen der 5-MOP-Konzentration und der UVA-Dosis überprüft werden, da diese auch im Mikrokerntest analog zu den Ergebnissen des HPRT-Assays (Abb. 6.4.1d), des Resazurin-Tests (Abb. 6.2.3c) und denen von Yurkow und Laskin (1991) zu erwarten ist. Dazu wird isobolographisch die UVA-Dosis als Funktion der 5-MOP-Konzentration aufgetragen, als zu betrachtende Effekte werden 100 bzw. 150 mikrokerntragende Zellen * 10⁻³ gewählt (Abb. 6.5.1e):

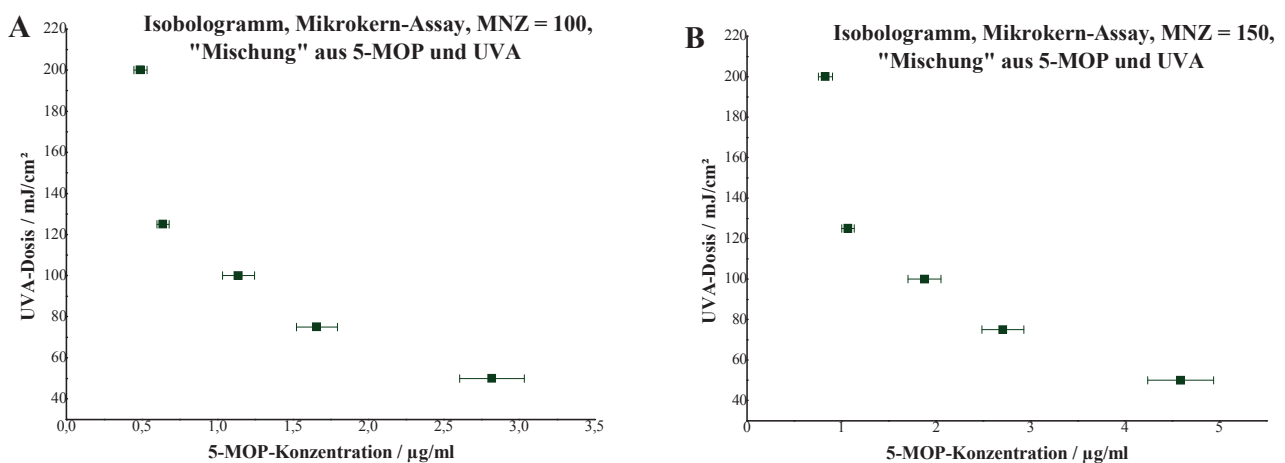


Abb. 6.5.1e: Isobolographische Darstellung der 5-MOP-/UVA-Kombinationen, die im Mikrokerntest zu 100 bzw. 150 * 10⁻³ MNZ als zu betrachtendem Effekt führen, mit der UVA-Dosis als Funktion der 5-MOP-Konzentration

Da weder 5-MOP noch UVA-Licht alleine eine Erhöhung der MNZ bewirken können, kann auch hier keine Ausgleichsgerade gefittet werden; dennoch ist hier eindeutig zu erkennen, dass die Werte entlang einer konkaven Linie liegen, weshalb auch hier eine synergistische Wechselwirkung der UVA-Strahlung und der 5-MOP-Konzentration gezeigt werden konnte.

6.5.2 Photo-Mikrokern-Test: Ergebnisse aller Reinsubstanzen

Auch hier werden analog zum Photo-HPRT-Test alle Furocumarine, Limettin und Khellin hinsichtlich ihrer relativen photoclastogenen Potenz im Vergleich zu 5-MOP untersucht, das auch im Photo-Mikrokern-Assay das potenteste FC ist. Da alle FCs bis auf Isoimperatorin auch hier abhängig von ihrer Konzentration entweder keinen Effekt oder eine lineare DRC aufweisen, können sie unter der Annahme, dass ihre photoclastogene Potenz UVA-dosisunabhängig ist, direkt über die Steigung ihrer Linearregressionen nach einer Bestrahlung mit 125 mJ/cm² miteinander verglichen werden. So können die Photoclastogenitäts-Äquivalenzfaktoren (Photoclastogenicity equivalency factors, PCEFs) im Vergleich zum potentesten Furocumarin, 5-MOP, berechnet werden nach:

$$PCEF_{\text{Furocumarin}} = \frac{\text{Steigung}_{\text{Furocumarin}}}{\text{Steigung}_{5\text{-MOP}}}$$

Die PCEFs sowie analoge $PCEF_{\mu\text{M}}$ sind in Tab. 6.5.2 alphabetisch aufgelistet; die zugehörigen Graphen befinden sich im Anhang:

Tab. 6.5.2: Steigungen der Linearregressionen (mikrokerntragende Zellen gegen Furocumarinkonzentration) und die daraus berechneten PCEFs im Mikrokern-Assay aller getesteten Furocumarine nach Bestrahlung mit 125 mJ/cm²

Substanz	Steigung Linear-regression	PCEF	Fehler PCEF	$PCEF_{\mu\text{M}}$	Fehler $PCEF_{\mu\text{M}}$
5-MOP	118,74 ± 7,4	1	0,062	1	0,0623
8-MOP	19,35 ± 2,47	0,163	0,021	0,163	0,021
Angelicin	0,47 ± 0,06	0,004	0,001	0,003	0,000
Bergamottin*	0,001 ± 0,00	0,001	0,001	0,002	0,001
Bergaptol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Byakangelicin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6',7'-Dihydroxy-bergamottin	17,66 ± 0,69	0,149	0,006	0,256	0,010
Epoxybergamottin	9,96 ± 0,36	0,084	0,003	0,137	0,005
Heraclenin	3,64 ± 0,49	0,031	0,004	0,041	0,006
Imperatorin	7,84 ± 0,44	0,066	0,004	0,083	0,005
Isobergapten	0,16 ± 0,02	0,001	0,000	0,001	0,000
Isoimperatorin	Kein linearer Verlauf, daher keine Linearregression möglich				
Isopimpinellin*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Khellin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Limettin	0,46 ± 0,05	0,004	0,000	0,004	0,000

Substanz	Steigung Linear-regression	PCEF	Fehler PCEF	PCEF _{μM}	Fehler PCEF _{μM}
Oxypeucedanin	14,09 ± 1,13	0,119	0,010	0,157	0,013
Oxypeucedanin-hydrat	14,33 ± 2,13	0,1201	0,018	0,170	0,025
Pimpinellin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phellopterin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Psoralen*	19,26 ± 1,30	0,162	0,011	0,140	0,009
Sphondin	1,74 ± 0,18	0,015	0,002	0,015	0,002
Xanthotoxol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*Literaturdaten, berechnet aus (Lohr 2009, Lohr et al. 2010); n.d. = nicht detektierbar

Wie schon in Abb. 6.5 dargestellt, zeigen alle Furocumarine, Limettin und Khellin ohne Lichteinfluss keine clastogenen Effekte. Nach der Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht sind allerdings sehr wohl photoclastogene Effekte zu beobachten, die in ihrer Ausprägung substanzabhängig stark variieren. Analog zu ihren Effekten im HPRT-Assay zeigen Bergaptol, Byakangelicin, Isopimpinellin, Khellin, Pimpinellin, Phellopterin und Xanthotoxol innerhalb ihrer Löslichkeitsgrenzen keine photoclastogenen Eigenschaften.

Für die getesteten photoclastogenen Furocumarine ergibt sich bezüglich ihres photoclastogenen Potentials (PCEF) folgende Reihenfolge, wobei die Einordnung von Isoimperatorin aufgrund der nichtlinearen DRC nicht möglich ist:

5-MOP > 8-MOP ≈ Psoralen > 6',7'-Dihydroxybergamottin > Oxypeucedaninhydrat > Oxypeucedanin > Epoxybergamottin > Imperatorin > Heraclenin > Sphondin > Angelicin = Limettin > Isobergapten = Bergamottin.

Diese ändert sich bei der Einstufung über PCEF_{μM} zu:

5-MOP > 6',7'-Dihydroxybergamottin > Oxypeucedaninhydrat > 8-MOP > Oxypeucedanin > Psoralen > Epoxybergamottin > Imperatorin > Heraclenin > Sphondin > Limettin ≈ Angelicin > Bergamottin > Isobergapten.

Auf die möglichen Ursachen und Bewertung dieser Ergebnisse wird ausführlich in der Diskussion (Kap.7) eingegangen.

6.5.3 Photo-Mikrokern-Test: Ergebnisse der Mischungen

Aufgrund der begrenzten Substanzmenge konnten nur Mix 1, 2, 5-8 (Tab. 6.1) zur Charakterisierung des photoclastogenen Potentials von Furocumarinen in Mischungen herangezogen werden. Die Daten wurden isobolographisch, über CI-Werte und das PMEF-Konzept verglichen.

6.5.3.1 Isobolographische Analyse

In Abb. 6.5.3.1 A-C sind die Daten der Photo-Mikrokern-Tests der mit 125 mJ/cm² UVA-Licht bestrahlten Inkubationen 5-MOP, 8-MOP, Mix 1, 5 und 6 als Isobologramme dargestellt. Als zu vergleichende Effekte wurde die Induktion von 100 (A), 150 (B) und 200 (C) mikrokerntragende Zellen * 10⁻³ gewählt.

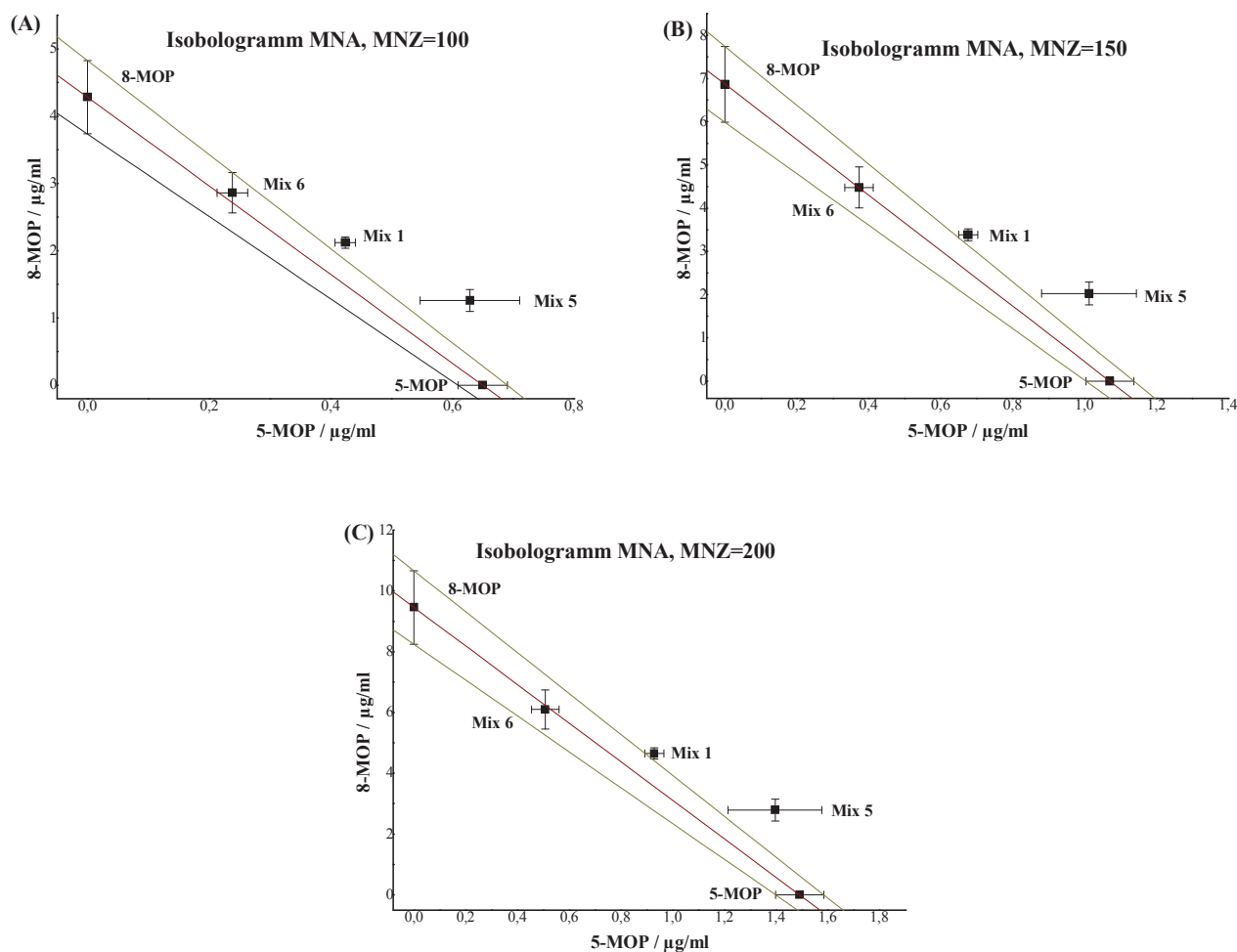


Abb. 6.5.3.1 A-C: Isobologramme von 5-MOP und 8-MOP im Photo-Mikrokerntest. Dargestellt ist 8-MOP als Funktion von 5-MOP, als zu betrachtende Effekte wurden 100 (A), 150 (B) und 200 (C) mikrokerntragende Zellen (MNZ) $\cdot 10^{-3}$ gewählt. Zugrundeliegende Daten sind die Linearregressionen der mit 125 mJ/cm^2 UVA-Licht bestrahlten Inkubationen mit den Reinstoffen 5-MOP, 8-MOP und deren Mischungen Mix 1, Mix 5 und Mix 6 (vgl. Tab. 6.1). Die angegebenen Fehler wurden aus den Fehlern der Linearregressionen berechnet (5-MOP $n=7$, 8-MOP $n=6$, Mix 1 $n=4$, Mix 5 $n=3$, Mix 6 $n=3$)

Analog zu Abb. 6.4.3.1 A-C (HPRT-Assay) stellen die in Abb. 6.5.3.1 A-C gezeigten weinroten Geraden die Isobolen der Konzentrationen der beiden Reinstoffen 5-MOP und 8-MOP dar, die jeweils für sich alleine eine Erhöhung der Zahl der mikrokerntragenden Zellen (MNZ) auf 100 (A), 150 (B) und 200 (C) $\cdot 10^{-3}$ in Kombination mit einer UVA-Dosis von 125 mJ/cm^2 bewirken. Auch hier sollten sich alle beliebigen Kombinationen von 5-MOP und 8-MOP, die den gleichen Effekt bewirken, auf dieser Iso-Effekt-Linie befinden, unter der Annahme, dass das Konzept der Dosis-Additivität auch hier anwendbar ist. Dies trifft bei allen betrachteten Effekten für die Daten von Mix 6 zu. Die Werte von Mix 1 liegen innerhalb der Fehlergrenzen nur bei der MNZ von $100 \cdot 10^{-3}$ minimal von der Isobole entfernt. Lediglich der stärker fehlerbehaftete Datenpunkt von Mix 5 liegt bei allen betrachteten Effekten gerade nicht auf der Isobole. Aufgrund der Art der Abweichungen der Daten aus den Mischungen von der Isobole kann allerdings auch nicht auf eventuelle konkave oder konvexe Veränderungen der Linie geschlossen werden, weshalb antagonistische oder synergistische Wechselwirkungen in

Mischungen von 5-MOP und 8-MOP praktisch ausgeschlossen werden können und weiterhin von dem Konzept der Dosis-Additivität ausgegangen werden kann.

6.5.3.2 Vergleich über Interaktions-Index CI

In Tab. 6.5.3.2 finden sich die nach $CI = \sum_{i=1}^n d_i / D_i$ berechneten Interaktions-Indizes CI für verschiedene Anzahlen mikrokerntragender Zellen von 50 bis $150 \cdot 10^{-3}$ aller im Photo-Mikrokern-Assay getesteten FC-Mischungen:

Tab. 6.5.3.2: CIs für verschiedene MNZ der getesteten FC-Mischungen

Substanz	CI MNZ = 50	CI MNZ = 60	CI MNZ = 75	CI MNZ = 100	CI MNZ = 125	CI MNZ = 150
5-MOP	$1 \pm 0,062$	$1 \pm 0,062$	$1 \pm 0,062$	$1 \pm 0,062$	$1 \pm 0,062$	$1 \pm 0,062$
Mix 1	$1,250 \pm 0,050^{###}$	$1,207 \pm 0,048^{###}$	$1,174 \pm 0,047^{###}$	$1,147 \pm 0,046^{##}$	$1,133 \pm 0,045^{##}$	$1,125 \pm 0,045^{##}$
Mix 2	$1,573 \pm 0,048^{###}$	$1,477 \pm 0,045^{###}$	$1,401 \pm 0,043^{###}$	$1,339 \pm 0,041^{###}$	$1,307 \pm 0,040^{###}$	$1,288 \pm 0,039^{###}$
Mix 5	$1,360 \pm 0,177$	$1,319 \pm 0,171$	$1,287 \pm 0,167$	$1,262 \pm 0,164$	$1,249 \pm 0,162$	$1,241 \pm 0,161$
Mix 6	$1,186 \pm 0,125$	$1,125 \pm 0,118$	$1,076 \pm 0,113$	$1,035 \pm 0,109$	$1,014 \pm 0,107$	$1,001 \pm 0,105$
Mix 7	$1,236 \pm 0,095$	$1,161 \pm 0,089$	$1,104 \pm 0,085$	$1,059 \pm 0,081$	$1,037 \pm 0,079$	$1,023 \pm 0,078$
Mix 8	$1,051 \pm 0,136$	$0,992 \pm 0,128$	$0,947 \pm 0,122$	$0,911 \pm 0,117$	$0,892 \pm 0,115$	$0,881 \pm 0,114$

Statistische Behandlung: Mischung vs. 5-MOP: *two-tailed student's t-test*, *Welch corrected*, $^{##} \leq 0,01$, $^{###} \leq 0,001$

Unter der Annahme strikt additiven Verhaltens sollten die berechneten CIs gleich 1 sein. Dies trifft innerhalb der Fehlergrenzen für alle betrachteten Effekte (MNZ zwischen 50 und $150 \cdot 10^{-3}$) für die Mischungen 5- 8 zu; hier konnten keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden. Die CIs von Mix 1 weichen jedoch zwischen 50-75 MNZ $\cdot 10^{-3}$ extrem signifikant, zwischen 100-150 MNZ $\cdot 10^{-3}$ sehr signifikant von 1 ab, die CIs von Mix 2 bei allen betrachteten Werten extrem signifikant. Im Fall von Mix 1 kann dies durch den sehr geringen Fehler von CI (ca. 4%) in der statistischen Betrachtung erklärt werden, was auch auf Mix 2 (ca. 3%) zutrifft. Mix 2 enthält zudem große Mengen des wenig potenten Limettins (100%: 50 $\mu\text{g/ml}$), weshalb die Konzentration, die zum Erreichen der betrachteten MNZ benötigt werden würden, theoretischer Natur sind und die Regressionsgerade aufgrund der geringen MNZ-Zahlen und großen intrinsischen Fehler, durch die sie gefittet wurde, selbst relativ fehlerbehaftet ist, auch hinsichtlich der Extrapolation der Werte. Zudem könnte Limettin die Targets für die potenteren FCs, 5-MOP und 8-MOP, blockieren, was in derart großen Konzentrationsbereichen zu antagonistischen Effekten führen könnte, was durch die CIs zwischen $1,573 \pm 0,048$ und $1,288 \pm 0,039$, also größer 1, bestätigt werden würde. Dies scheint allerdings nicht sehr wahrscheinlich, da das maximale (Furo-)cumarin-Nucleotid-Bindungsverhältnis an der reinen DNA von 5-MOP und 8-MOP mehr als dreifach höher als das von Limettin ist

(Ou et al. 1978) und somit eine derart effektive Verdrängung der potenteren FCs kaum möglich scheint.

Da allerdings bei Mix 5-8 keine signifikanten Abweichungen und zudem keine eindeutiger Trend der geringen Abweichungen (größer oder kleiner 1) zu verzeichnen sind, kann kein allgemeiner Trend für Furocumarin-Mischungen bezüglich antagonistischer oder synergistischer Mischungseffekte im Photo-Mikrokern-Test über den Interaktions-Index CI beobachtet werden.

6.5.3.3 Vergleich über PCEF-Konzept

Analog zum Photo-HPRT-Assay (6.4.3.3) zeigt Abb. 6.5.3.3 A-F die Auftragungen der mikrokerntragenden Zellen MNZ der einzelnen Mischungen gegen die hypothetischen PCEQ-Konzentrationen in $\mu\text{g/ml}$. Berechnet wurden diese aus den in Tab. 6.5.2

bestimmten PCEFs nach $PCEQ[\mu\text{g/ml}] = \sum_{i=1}^n PCEF_i \times \text{Konz.}_i[\mu\text{g/ml}]$:

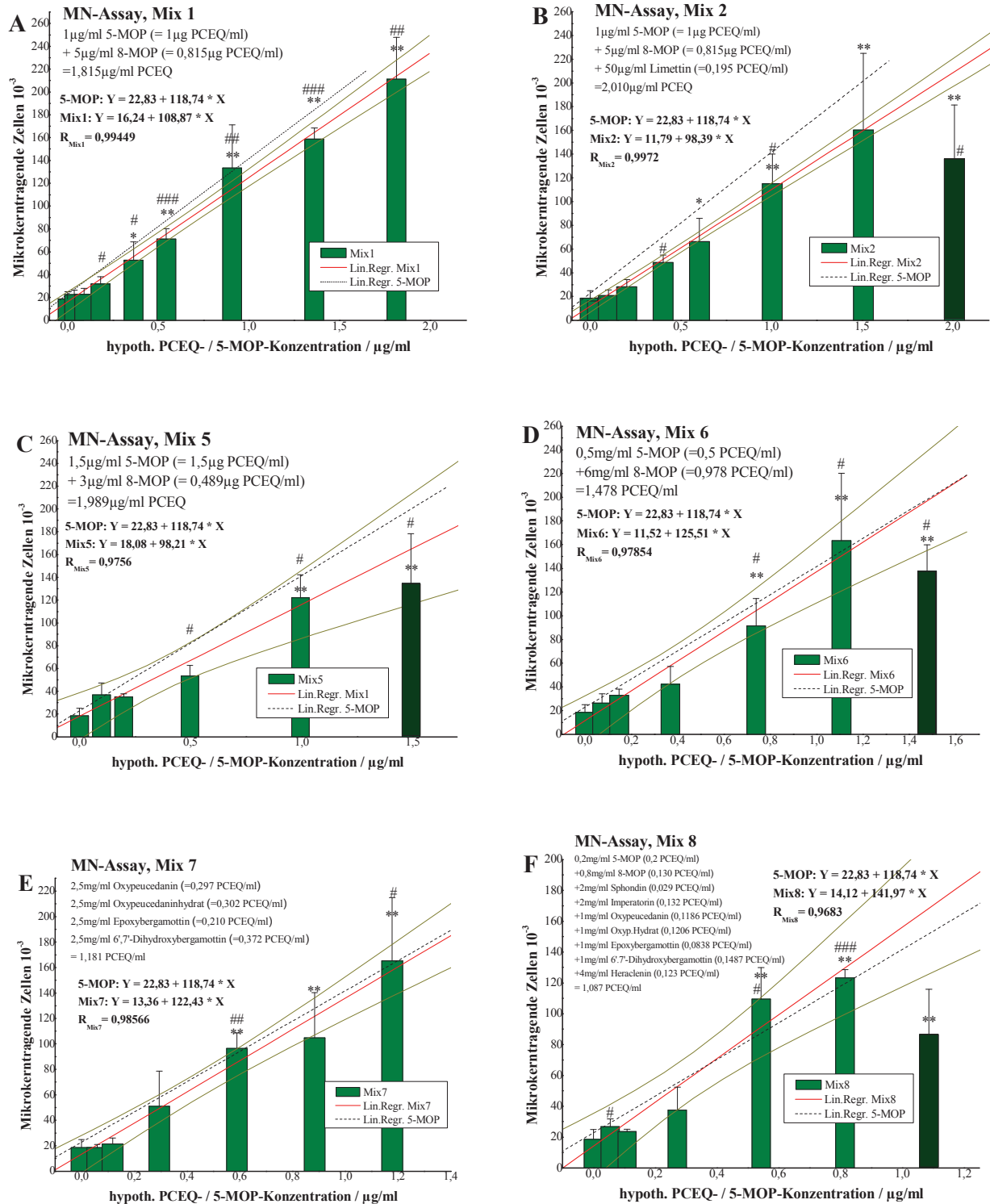


Abb. 6.5.3.3 A-F: MNA zur Erfassung photogentoxischer Effekte der Furocumarinmischungen aus Tab. 6.1. Dargestellt sind die Auftragungen der MNZ $\cdot 10^{-3}$ gegen variable PCEQ-Konzentrationen nach Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht, die zugehörigen Linearregressionen (rot) mit einem 95%-Konfidenz-Intervall (dunkelgelb) und zum Vergleich die Gerade von 5-MOP (schwarz gestrichelt); dunkelgrüne Balken: wegen Zytotoxizität / Zytostatik nicht berücksichtigte Werte (5-MOP n=7, Mix1 n=4, Mix2 n=3, Mix5 n=3, Mix6 n=3, Mix7 n=3, Mix8 n=3); p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # $\leq 0,05$, ## $\leq 0,01$, ### $\leq 0,001$)

Bei Anwendbarkeit des PCEF-Konzepts sollten die Regressionsgeraden der Auftragungen mikrokerntragender Zellen gegen die PCEQs der Mischungen deckungsgleich mit der Regressionsgeraden von 5-MOP sein. Diese liegt bei Mix 5-8 vollständig im 95 % Konfidenzintervall der Mischungen, bei Mix 1 aufgrund des geringen Fehlers der Linearregression geringfügig darüber. Bezieht man das 95 % Konfidenzintervall von 5-MOP in diese Betrachtung mit ein (der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt), stimmen die Regressionsgeraden der Mischung 1 mit der von 5-MOP überein. Nur die Regressionsgerade von Mix 2 stimmt auch unter Einbezug des 95 % Konfidenzintervalls von 5-MOP nicht mit der von 5-MOP überein, sondern liegt deutlich darunter, was auf die unter 6.5.3.2 schon genannten Gründe zurückführbar sein könnte.

Eine Übersicht über die Steigungen der einzelnen Linearregressionen und ihre Abweichungen gibt zur besseren Vergleichbarkeit Tab. 6.5.3.3:

Tab. 6.5.3.3: Steigungen der Linearregressionen aus 6.5.3.3 A-F und Abweichungen von 5-MOP

Mischung	Steigung Linearregression / MNZ* μg^{-1} *ml	Abweichung von 5-MOP	Signifikanz*
5-MOP	118,75 \pm 7,40	0 %	n.s.
Mix 1	108,87 \pm 4,34	-8,31 %	#
Mix 2	98,39 \pm 3,01	-17,14 %	###
Mix 5	98,21 \pm 12,76	-17,30 %	n.s.
Mix 6	125,51 \pm 13,22	5,69 %	n.s.
Mix 7	122,43 \pm 9,38	3,10 %	n.s.
Mix 8	141,97 \pm 18,31	19,56 %	n.s.

*Statistische Behandlung: Mischung vs. 5-MOP: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, n.s. = nicht signifikant, # $\leq 0,05$, ### $\leq 0,001$)

In Übereinstimmung mit den graphischen Betrachtungen ist in Tab. 6.5.3.3 zu sehen, dass nur die Steigungen der Linearregression von Mix 2 extrem signifikant, die von Mix 1 signifikant von der von 5-MOP abweicht. Der Betrag der Abweichung von Mix 5 und Mix 8 liegt zwar in der gleichen Größenordnung wie der von Mix 2, kann allerdings aufgrund des größeren Konfidenzintervalls, innerhalb dessen die Regressionsgerade von 5-MOP liegt, als statistisch nicht signifikant eingestuft werden. Zudem kann kein eindeutiger Trend beobachtet werden, ob die CIs der Mischungen größer oder kleiner 1 sind. Daher kann geschlossen werden, dass das PCEF-Konzept im Prinzip auf alle Furocumarine und Limettin anwendbar ist.

Analog zum Photo-HPRT-Assay soll auch hier überprüft werden, ob es sich um Dosis- oder Effekt-Additivität handelt, auch wenn dies prinzipiell aufgrund der Linearität der DRC für die Anwendbarkeit des PCEF-Konzepts unerheblich ist. Eine Auftragung der MNZ gegen eine variable 5-MOP-Konzentration, wobei jeweils fixe Konzentrationen 8-MOP (0, 1, 1,5, 2, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt wurden, ergibt wie Abb. 6.4.3.3b folgendes Bild (Abb. 6.5.3.3b) (Cassee et al. 1998, Marquardt and Schäfer 2004, Pösch et al. 1990, Pösch and Holzmann 1980):

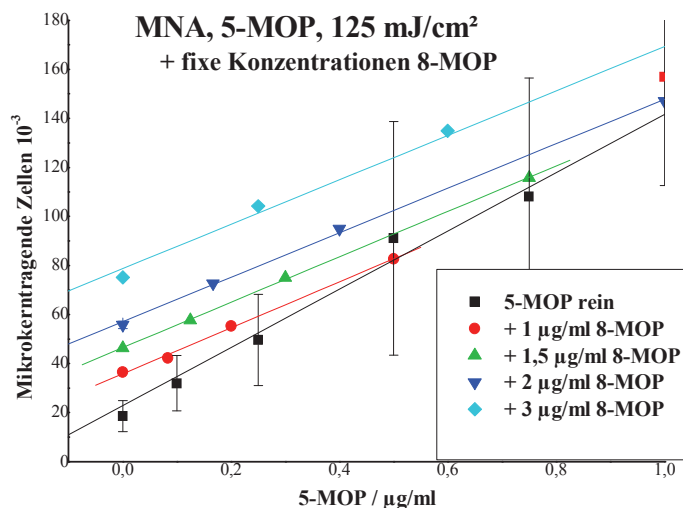


Abb. 6.5.3.3b: Photo-Mikrokern-Test, Auftragung MNZ gegen variable 5-MOP-Konzentrationen mit Zusatz von 0, 1, 1,5, 2 oder 3 $\mu\text{g/ml}$ 8-MOP mit dazugehörigen Regressionsgeraden

Abb. 6.5.3.3b zeigt, bis auf die der Reinsubstanz 5-MOP selbst, parallelverschobene Regressionsgeraden der Auftragung MNZ gegen 5-MOP-Konzentration mit zunehmender 8-MOP-Konzentration. Es ist daher trotz abweichender DRC ohne 8-MOP-Zusatz wie im Photo-HPRT-Assay zu schlussfolgern, dass es sich hierbei um eine Dosis-Additivität handelt, da die Ergebnisse aus der Phototoxizitätsprüfung und die Korrelation der Mikrokernbildung mit der DNA-Adduktbildung, also des gleichen Targets von 5-MOP und 8-MOP, auf Dosis-Additivität schließen lassen (Cassee et al. 1998, Marquardt and Schäfer 2004, Pöch et al. 1990, Pöch and Holzmann 1980).

6.6 Absorptionsspektren

Da einige Furocumarine in den zellbasierten Assays völlig inaktiv sind, soll hier in einem ersten Schritt überprüft werden, ob sie überhaupt als potentielle Phototoxine eingestuft werden können. Nach der OECD, CIE und FDA müssen sie folgende Kriterien erfüllen:

- Absorption zwischen 280 bzw. 290 - 700 nm
- Molarer Extinktions-/Absorptionskoeffizient ϵ größer $10 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ bzw. $\log \epsilon$ größer 1 (OECD 2004, FDA 2003)

Um den Bezug zum biologischen System herzustellen, wurden die UV/Vis-Absorptionsspektren $53 \mu\text{M}$ in $0,3 \text{ mM}$ Natriumphosphat-(NaPi)-Puffer ($\text{pH} = 7,1$) von 230 – 480 nm aufgenommen. Im Allgemeinen ähneln sich die Absorptionsspektren der FCs sehr; exemplarisch ist in Abb. 6.6 das Absorptionsspektrum von Oxypeucedanin gezeigt, da sich bei dieser Substanz die unter 6.7 untersuchten Effekte besonders gut verdeutlichen lassen, die übrigen Spektren befinden sich im Anhang.

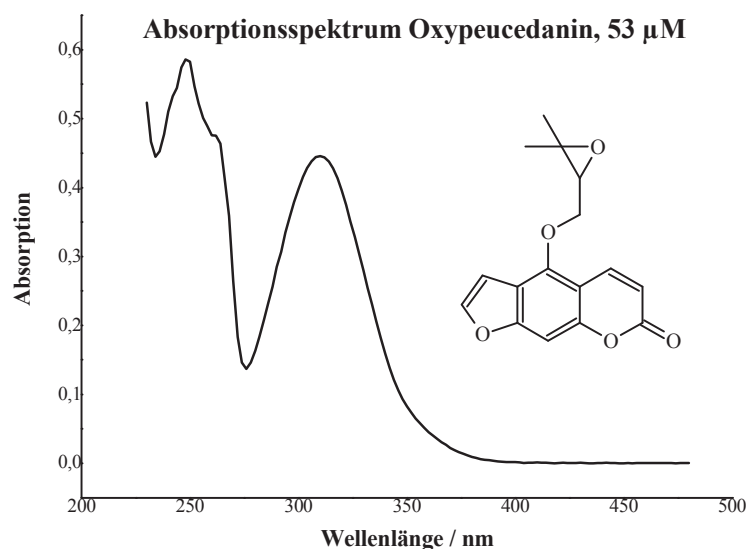


Abb. 6.6: Absorptionsspektrum von Oxypeucedanin, 53 μ M in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1

In Tab. 6.6 sind die drei langwelligsten Absorptionsmaxima der getesteten Furocumarine und der ähnlicher Verbindungen mit zugehörigem logarithmierten molaren Absorptionskoeffizienten $\log \epsilon_{\max}$ aufgeführt:

Tab. 6.6: Die drei langwelligsten Absorptionsmaxima ($\lambda_{\max 1-3}$) der untersuchten (Furo-)cumarine und deren logarithmierte molare Absorptionskoeffizienten $\log \epsilon_{\max 1-3}$

Substanz	$\lambda_{\max 1}$ / nm	$\log \epsilon_{\max 1}$	$\lambda_{\max 2}$ / nm	$\log \epsilon_{\max 2}$	$\lambda_{\max 3}$ / nm	$\log \epsilon_{\max 3}$
5-MOP	314	3,83	266	3,86	248	3,84
8-MOP	303	4,05	262	4,10	248	4,30
Angelicin	302	3,98	246	4,31		
Bergamottin	338	4,01	274	4,00	246	3,93
Bergaptol	386	3,62	322	4,06	258	4,28
Byakangelicin	314	3,90	268	4,08	246	4,00
Coumarin	308	3,90	278	4,14	246	3,94
6',7'-Dihydroxy-bergamottin	312	4,13	250	4,24		
Epoxybergamottin	312	4,03	250	4,12		
Heraclenin	302	4,02	246	4,30		
Imperatorin	304	4,00	248	4,25		
Isobergapten	311	3,57	266	3,63	250	3,68
Isoimperatorin	310	3,49	264	3,51	250	3,52
Isopimpinellin	314	3,98	266	4,14	248	4,01
Khellin	337	3,69	282	3,70	248	4,62
Limettin	328	4,11	254	3,79	248	3,77
Oxypeucedanin	310	4,13	262	4,16	248	4,25
Oxypeucedaninhydrat	312	4,15	263	4,19	258	4,18
Pimpinellin	306	3,95	252	4,28		

Substanz	$\lambda_{\max 1}$ / nm	$\log \epsilon_{\max 1}$	$\lambda_{\max 2}$ / nm	$\log \epsilon_{\max 2}$	$\lambda_{\max 3}$ / nm	$\log \epsilon_{\max 3}$
Phellopterin	314	3,75	268	3,84	248	3,77
Psoralen	328	3,86	296	4,06	244	4,37
Sphondin	336	3,74	302	3,85		
Xanthotoxol	315	4,12	282	4,22	266	4,31

Alle untersuchten (Furo-)cumarine zeigen bei Wellenlängen $\lambda > 280$ nm mindestens ein Absorptionsmaximum, für die alle gilt: $\log \epsilon_{\max} > 1$; alle weisen einen logarithmierten molaren Absorptionskoeffizienten von $\log \epsilon_{\max} \approx 4$ auf. Somit können alle getesteten Substanzen nach Grotthus und Draper prinzipiell als potentiell photochemisch reaktiv betrachtet werden. Zudem liegt das langwelligste Absorptionsmaximum aller FCs mindestens im Bereich um 310 nm, also dem gleichen Bereich wie das des potentesten FCs, 5-MOP, λ_{\max} von Bergamottin, Bergaptol, Khellin, Psoralen und Sphondin liegt sogar noch näher an λ_{\max} der benutzten Strahlungsquelle (365 nm), womit die Betrachtung der Absorptionsspektren noch nicht ausreichend die Unterschiede in der Reaktivität in den biologischen Systemen erklärt.

6.7 Interkalation zwischen DNA-Basen

Da die Ausbildung eines Furocumarin-DNA-Komplexes ein essentieller Schritt für die FC-Addukt-Bildung ist, werden in diesem Kapitel über den Vergleich der Absorptionsspektren der FC bei fixen Konzentrationen (53 μM) in Gegenwart verschieden konzentrierter doppel- und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA_{DS} bzw. DNA_{SS} ; Konzentrationen 0, 25, 50, 75 und 100 * 53 μM bezogen auf ein Nukleotid) Rückschlüsse auf das Interkalationsverhalten der FCs gezogen. Dies erfolgt einerseits über die Hypochromie, andererseits über die Verschiebung Richtung längerer Wellenlängen von λ_{\max} (Beaumont et al. 1980, Cimino et al. 1985, Dall'Acqua et al. 1978, Dall'Acqua et al. 1981, Mahler, Kline and Mehrotra 1964, Musajo and Rodighiero 1972, Ou et al. 1976, Ou et al. 1978). Möglicherweise ist die unterschiedliche Reaktivität der FCs in biologischen Systemen auf mangelnde Interkalation zurückzuführen.

Als Beispiel zur Verdeutlichung wurde in Abb. 6.7 Oxypeucedanin gewählt, da hier sowohl die Hypochromie des langwelligsten Absorptionsmaximums λ_{\max} als auch dessen Rotverschiebung sehr gut zu sehen ist; die Spektren der übrigen Substanzen befinden sich im Anhang.

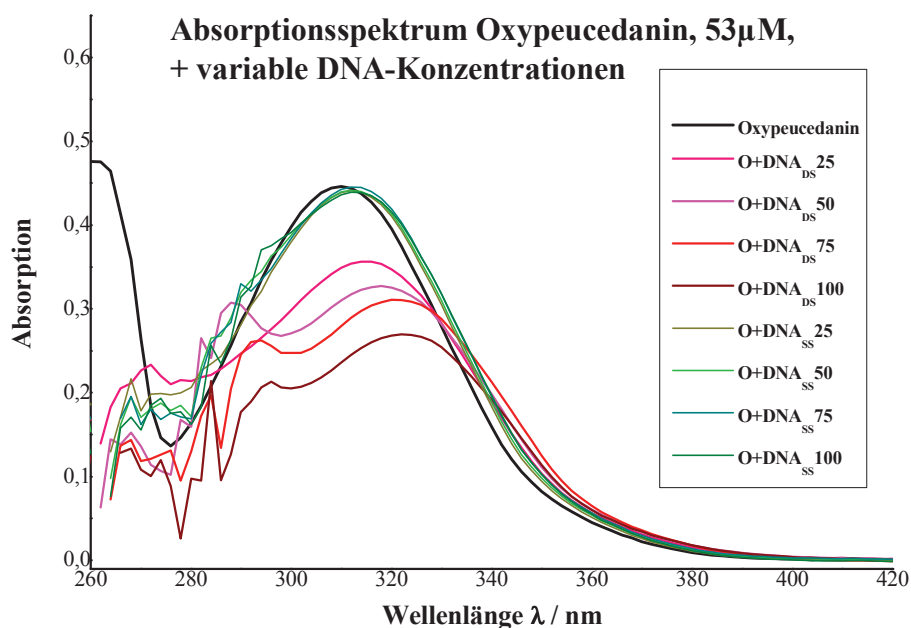


Abb. 6.7: Absorptionsspektrum von Oxypeucedanin im Bereich des langwelligsten Absorptionsmaximums, 53 μM in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1, in Kombination mit verschieden konzentrierter doppel- und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA_{DS} bzw. DNA_{SS} ; Konzentrationen 0, 25, 50, 75 & 100 * 53 μM bezogen auf ein Nukleotid)

Über diese Methode können allerdings keine absoluten Rückschlüsse auf die Komplexbildungskonstanten oder die Anzahl interkalierter Moleküle pro Nukleotid gezogen werden, sondern es kann nur indikativ abgeschätzt werden, ob es generell zur Komplexbildung kommt, da die Absolutwerte der maximal möglichen Hypochromie oder Rotverschiebung aller einzelnen Furocumarine nicht bekannt sind und die Intensitäten der Absorptionsmaxima unterschiedlich sind. Zudem kommt es bei der Bestimmung des Absorptionsmaximums im Bereich kürzerer Wellenlängen zu Schwierigkeiten durch die Überlagerung des FC-Spektrums mit dem der DNA. Diese Problematik könnte über die Bestimmung der Hypochromie / Blauverschiebung über die Fluoreszenzspektren der FC umgangen werden, was in diesem Versuchsaufbau nicht möglich war (Beaumont et al. 1980).

6.7.1 Hypochromer Effekt

Abb. 6.7.1 zeigt exemplarisch die relativen Intensitäten des langwelligsten Absorptionsmaximums (310 nm) von Oxypeucedanin (53 μM) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen (25, 50, 75 & 100 * 53 μM bezogen auf ein Nukleotid) von doppelsträngiger ($\text{DNA}_{25-100\text{ds}}$) und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA ($\text{DNA}_{25-100\text{ss}}$) im Vergleich zur Absorption von Oxypeucedanin in reinem Puffer. Abb. 6.7 zeigt die zugehörigen Absorptionsspektren.

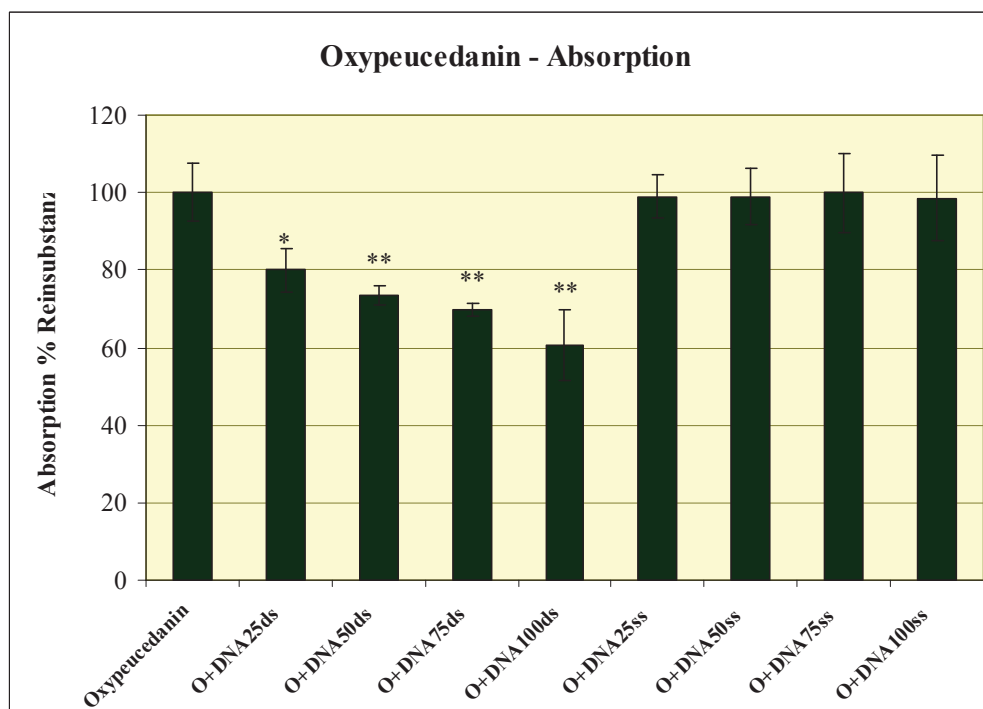


Abb. 6.7.1: Relative Hypochromie von λ_{\max} (310 nm) von Oxypeucedanin ($53 \mu\text{M}$ in $0,3 \text{ mM}$ NaPi-Puffer, $\text{pH}=7,1$) in Gegenwart versch. Konz. (25, 50, 75 & $100 \cdot 53 \mu\text{M}$ bez. auf 1 Nukleotid) von doppelsträngiger (DNA25-100ds) und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA25-100ss) im Vergleich zu Absorption von Oxypeucedanin in reinem Puffer ($n=3$; p-value: Oxypeucedanin im Puffer vs. O+DNA: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, $* \leq 0,05$, $** \leq 0,01$)

Zu erkennen ist in Abb. 6.7.1 eine DNA_{DS}-konzentrationsabhängige Abnahme der relativen Absorption von Oxypeucedanin in Gegenwart von doppelsträngiger DNA im Vergleich zur Absorption in reinem NaPi-Puffer. Bereits bei $25 \cdot 53 \mu\text{M}$ ist eine signifikante Hypochromie auf $79,9 \pm 5,8 \%$ zu verzeichnen, danach nimmt die Absorption weiter sehr signifikant bis auf $60,5 \pm 9,0 \%$ ab. In Gegenwart von einzelsträngiger DNA ist erwartungsgemäß keine signifikante Reduktion der Absorption zu sehen, wie auch schon von Ou et al. (1976 & 1978) für Limettin und 8-MOP gezeigt werden konnte.

Tab. 6.7.1 zeigt die Abnahme von λ_{\max} aller (Furo-)cumarine in Gegenwart doppelsträngiger DNA (25, 50, 75 & $100 \cdot 53 \mu\text{M}$ bezogen auf ein Nukleotid) und $100 \cdot 53 \mu\text{M}$ einzelsträngiger DNA im Vergleich zur Absorption des FCs in reinem Puffer in Prozent:

Tab. 6.7.1: Hypochromie von λ_{\max} aller FCs: Abnahme auf % Ausgangswert

Substanz	λ_{\max} / nm	Rein-Substanz	DNA _{DS} 25-fach	DNA _{DS} 50-fach	DNA _{DS} 75-fach	DNA _{DS} 100-fach	DNA _{SS} 100-fach
5-MOP*	315	(100±4,7)	102,7±1,9	93,1±12,7	88,3±8,0	84,5±12,4	(74,1±3,7)
8-MOP	303	100±3,1	83,0±3,1	75,7±2,6	74,9±2,9	67,1±2,7	88,6±13,1
Angelicin	302	100±2,8	85,4±4,0	83,7±3,9	81,0±3,3	74,9±4,1	103,4±19,1
Bergamottin	338	Wegen schlechter Löslichkeit nicht detektierbar					
Bergaptol	386	100±5,0	95,6±3,8	82,3±4,4	77,1±5,7	80,0±9,4	117,4±5,4
Bergaptol	322	100±6,0	105,5±1,7	98,9±1,8	92,0±4,7	96,3±7,0	105,8±6,3
Byakangelicin	314	100±1,4	82,3±3,9	72,3±1,0	62,9±5,5	64,6±4,2	101,0±11,3
Coumarin	308	100±8,9	98,7±3,0	91,3±2,2	84,2±9,8	88,3±4,1	84,8±8,4
6',7'-Dihydroxybergamottin	312	100±0,9	81,5±2,8	74,5±2,7	73,5±3,0	67,5±2,4	96,5±6,5
Epoxybergamottin	312	100±4,0	90,5±4,6	94,0±10,8	89,0±2,4	85,6±7,9	110,0±11,1
Heraclenin	302	100±9,5	88,2±9,6	84,9±12,4	78,2±9,9	70,6±10,6	85,3±29,3
Imperatorin	304	100±8,9	95,0±5,3	95,0±3,9	91,8±6,9	89,7±7,0	91,4±19,1
Isobergapten*	311	(100±9,0)	86,7±4,9	95,6±5,4	89,7±10,2	87,0±14,8	(79,7±2,0)
(Isoimperatorin)*	310	(100±13,6)	115,4±6,7	123,6±19,3	185,4±9,9	148,6±65,3	(105,9±10,9)
Isopimpinellin	314	100±7,7	74,6±15,3	54,4±17,1	59,3±20,0	34,2±9,7	82,0±0,4
Khellin	337	100±1,3	93,2±1,6	94,3±11,3	80,3±3,8	80,8±7,11	86,6±9,1
Limettin	328	100±9,7	91,6±4,8	86,9±2,8	80,3±4,1	61,6±9,2	95,4±3,0
Oxypeucedanin	310	100±7,4	79,9±5,8	73,4±2,6	69,7±1,8	60,5±9,0	98,5±10,9
Oxypeucedanin-hydrat	312	100±4,3	73,5±5,7	66,2±2,4	66,0±4,3	58,0±6,8	101,7±20,4
Pimpinellin	306	100±14,0	108,2±4,4	100,2±5,5	92,6±5,2	66,7±12,7	110,2±17,5
Phellopterin*	314	(100±12,3)	104,4±8,8	(115,5±10,9)	100,5±31,0	92,1±24,6	(102,6±27,6)
Psoralen	296	100±3,1	85,3±3,2	79,7±3,7	70,5±7,4	60,5±9,7	104,4±14,5
Sphondin	302	100±5,1	75,0±3,7	70,3±1,7	70,1±0,8	61,9±1,8	81,5±6,8
Sphondin	336	100±5,8	76,6±3,6	71,9±1,5	72,0±0,2	63,5±2,2	81,9±2,7
Xanthotoxol	315	100±1,3	87,9±1,8	88,0±3,4	87,1±1,2	76,7±2,6	95,4±0,6

*/(): Wegen Löslichkeitsproblemen nicht zuverlässige Werte; Erläuterungen siehe Text

Bei 8-MOP, Angelicin, Bergaptol (386 nm), Byakangelicin, 6',7'-Dihydroxybergamottin, Epoxybergamottin, Heraclenin, Isopimpinellin, Limettin, Oxypeucedanin, Oxypeucedaninhydrat, Pimpinellin, Psoralen, Sphondin und Xanthotoxol zeigen sich deutliche hypochrome Effekte in Gegenwart von DNA_{DS} im Vergleich zur Absorption in reinem Puffer, die in Kombination mit DNA_{SS} nicht oder deutlich schwächer zu erkennen sind, was bereits früher für 8-MOP und Limettin gezeigt wurde (Musajo and Rodighiero 1972, Ou et al. 1976, Ou et al. 1978).

Diese Hypochromie war bei anderen FCs wie Bergaptol (322 nm), Coumarin oder Imperatorin nicht ausgeprägt, was auf eine geringe Komplex-Bildungskonstante schließen lassen könnte. Im Fall von Coumarin war dies allerdings erwartet, da es nicht in die DNA

interkaliert (Ou et al. 1978). Bei Bergaptol bliebe zu überprüfen, auf welchen Übergang $\lambda_{\max} = 322$ nm zurückzuführen ist und ob dieser überhaupt durch eine Interkalation zu modifizieren ist, da eine Hypochromie des langwelligsten Absorptionsmaximums (386 nm) durchaus gezeigt werden konnte. Weiterhin war bei einigen FCs eine Hypochromie auch in Kombination mit DNA_{SS} zu verzeichnen. Dies kann allerdings auch auf eine gewisse Viskosität der DNA-Lösung zurückzuführen sein, die bei DNA_{SS} deutlich ausgeprägter als bei DNA_{DS} war. So konnten einerseits Pipettierfehler durch verstärktes Anhaften der Lösung an der Pipettenspitze, andererseits eine möglicherweise veränderte Oberflächenspannung die Folge sein, wodurch eine einheitliche Schichtdicke in der Lochplatte im Vergleich zu einer Küvette nicht garantiert werden konnte. Daher sollte bei der Interpretation der Daten eher die Rotverschiebung des Absorptionsmaximums (6.7.2) stärker gewertet werden, da diese schichtdickenunabhängig ist.

Bei 5-MOP, Isobergapten, Isoimperatorin und Phellopterin kann im Spektrum der reinen Substanz und der Kombination mit DNA_{SS} im Vergleich zu ihren Kombinationen mit DNS_{DS} kein Abfall der Absorption auf deren Absorptionsminimum im Bereich größerer Wellenlängen verzeichnet werden (vgl. Spektren im Anhang), was auf ausgefallene Feststoffe, d.h. ungelöste Furocumarine, schließen lässt. Daher sind alle bei diesen Substanzen bestimmte Absorptionswerte, zumindest in Kombination mit hohen DNA_{SS}-Konzentrationen, nicht verlässlich. Dennoch kann bei diesen Substanzen auf Interkalation geschlossen werden, da sie in Gegenwart von DNA_{DS} vollständig gelöst sind, nicht jedoch in reinem Puffer oder in Gegenwart einzelsträngiger DNA, und die Gegenwart von doppelsträngiger DNA die Löslichkeit von Furocumarinen erhöht, wie z.B. von Musajo (1972) an 5-MOP gezeigt (Musajo and Rodighiero 1972, Musajo et al. 1965).

Ou et al. (1978) konnten bei sukzessiver Zugabe von doppelsträngiger Kalbsthymus-DNA bei 8-MOP bei einem Verhältnis von 8-MOP:Nukleotid 1:50 ein Erreichen eines Hypochromie-Plateaus, d.h. keiner weiteren Abnahme von λ_{\max} bei DNA_{DS}-Zugabe, zeigen. So konnte auf eine maximal mögliche Interkalation von 1 Molekül 8-MOP pro 25 Basenpaare geschlossen werden, was durch Fluoreszenzmessungen und Photo-Bindungs-Experimente mit radioaktiv markiertem 8-MOP bestätigt werden konnte; durch photochemische Addition von 5-MOP und 8-MOP an doppelsträngige DNA konnte ebenfalls ein maximales Bindungsverhältnis von 5/8-MOP:Nukleotid von 1:60-66 bestimmt werden (Isaacs, Wieseahn and Hallick 1984). Ein analoges Hypochromie-Plateau wurde für Limettin bei einem Verhältnis Limettin:Nukleotid 1:160 gezeigt (Ou et al. 1976, Ou et al. 1978). So kann indikativ über das Erreichen des Hypochromie-Plateaus das maximal mögliche Verhältnis FC-Molekül:Nucleotid abgeschätzt werden, was nach dem Abgleich mit den Daten der Rotverschiebung von λ_{\max} in 6.7.2 diskutiert werden soll.

6.7.2 Rotverschiebung des Absorptionsmaximums λ_{\max}

Abb. 6.7.2 zeigt exemplarisch die Wellenlängen λ_{\max} des langwelligsten Absorptionsmaximums (310 nm) von Oxypeucedanin (53 μM) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen (0, 25, 50, 75 und 100 * 53 μM bezogen auf ein Nukleotid) von doppelsträngiger (DNA25-100ds) und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA25-100ss) in Abhängigkeit von der Konzentration und Denaturierung der DNA, Abb. 6.7 zeigt die zugehörigen Absorptionsspektren.

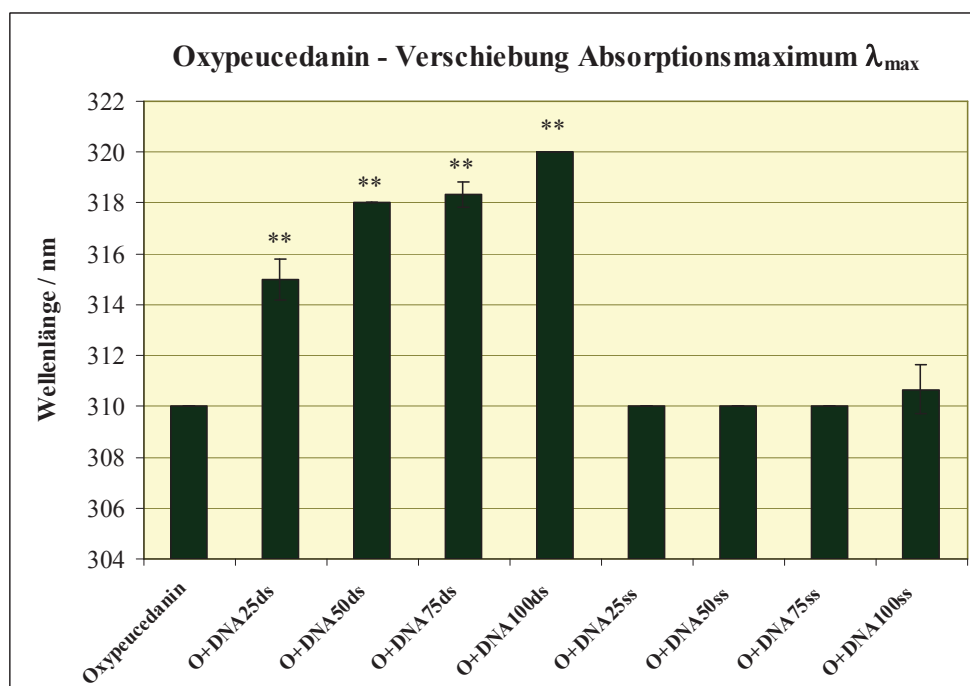


Abb. 6.7.2: Rotverschiebung von λ_{\max} (310 nm) von Oxypeucedanin (53 μM in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1) in Gegenwart versch. Konz. (25, 50, 75 & 100 * 53 μM bez. auf 1 Nukleotid) von doppelsträngiger (DNA25-100ds) und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA25-100ss) im Vergleich zu Absorption von Oxypeucedanin in reinem Puffer (n=3; p-value: Oxypeucedanin im Puffer vs. O+DNA: one-way ANOVA+Dunnnett's post test, ** $\leq 0,01$)

Zu erkennen ist in Abb. 6.7.2 eine DNA_{DS}-konzentrationsabhängige Verschiebung des Absorptionsmaximums von Oxypeucedanin in Gegenwart von doppelsträngiger DNA im Vergleich zur Absorption in reinem NaPi-Puffer. Bereits bei 25 * 53 μM DNA_{DS} ist eine sehr signifikante Rotverschiebung um $5,0 \pm 0,8$ nm von 310 nm auf $315 \pm 0,8$ nm zu sehen, die sich weiter nichtlinear um insgesamt $10,0 \pm 0,0$ nm auf $320 \pm 0,0$ nm bei 100 * 53 μM DNA_{DS} erhöht. Eine geringfügige, nicht signifikante Erhöhung von λ_{\max} ist bei der Kombination mit 100 * 53 μM DNA_{SS} zu sehen; dies ist höchstwahrscheinlich auf geringe Mengen nicht denaturierter DNA zurückzuführen, da eine Komplexbildung mit denaturierter DNA und somit eine Rotverschiebung von λ_{\max} nicht zu erwarten ist (Ou et al. 1976, Ou et al. 1978).

Tab. 6.7.1 zeigt die Differenz der Rotverschiebung von λ_{\max} aller (Furo-)cumarine in Gegenwart doppelsträngiger DNA (25, 50, 75 & 100 * 53 μM bezogen auf ein Nukleotid) und 100 * 53 μM einzelsträngiger DNA im Vergleich zur Absorption des FCs in reinem Puffer in nm:

Tab. 6.7.2: Rotverschiebung λ_{\max} aller FCs in Gegenwart von doppel- und einzelsträngiger DNA in nm

Substanz	λ_{\max} / nm	DNA _{DS} 25-fach	DNA _{DS} 50-fach	DNA _{DS} 75-fach	DNA _{DS} 100-fach	DNA _{SS} 100-fach
5-MOP	314,4±0,7	6,7±0,9	7,74±0,4	9,4±0,4	9,6±0,0	1,9±0,5
8-MOP*	303±0,8	3,0±0,0	5,7±0,5	7,0±0,0	8,3±0,9	-2,0±5,0
Angelicin*	302±0,0	2,0±0,0	3,3±0,9	3,7±0,5	-0,7±6,8	-4,7±3,4
Bergamottin	338	Wegen schlechter Löslichkeit nicht detektierbar				
Bergaptol	322±0,0	2,0±0,0	2,0±0,0	2,0±0,0	2,0±0,0	2,0±0,0
Bergaptol	386±0,8	-0,33±0,9	-1,7±2,5	-2,7±3,1	-1,0±1,6	0,7±1,3
Byakangelicin	314±0,0	3,3±0,9	4,7±0,5	6,7±1,3	7,7±0,5	1,0±0,8
Coumarin	308±0,0	-0,3±0,5	-0,7±0,9	0,0±1,6	-0,3±0,5	0,0±1,2
6',7'-Dihydroxybergamottin	312±0,0	4,0±0,0	6,0±0,0	6,7±0,9	8,0±0,0	0,0±0,0
Epoxybergamottin	312±0,0	4,0±0,0	6,0±0,0	7,7±0,5	8,7±0,9	0,7±0,5
Heraclenin*	302±0,8	-0,1±0,8	4,3±0,0	6,3±0,0	4,3±0,0	-1,7±0,0
Imperatorin	304±0,0	0,7±0,9	2,1±0,8	3,3±1,0	3,3±2,0	0,5±0,0
Isobergapten	312±1,4	6,0±0,0	6,7±0,9	7,7±1,7	7,7±0,5	0,5±1,5
Isoimperatorin	310±0,9	7,3±0,8	9,0±0,9	10,7±0,9	11,2±0,9	0,5±0,0
Isopimpinellin	314±0,0	1,3±3,8	4,0±5,7	9,7±0,5	9,0±0,8	1,3±0,5
Khellin	337±0,8	1,0±0,0	1,0±0,0	2,0±0,8	3,0±0,0	0,3±0,9
Limettin	328±0,0	2,0±0,0	4,7±0,5	6,3±0,5	8,0±0,0	1,5±0,5
Oxypeucedanin	310±0,0	5,0±0,8	8,0±0,0	8,3±0,5	10,0±0,0	0,7±0,9
Oxypeucedaninhydrat	312±0,0	6,0±0,0	8,0±0,0	10,0±0,0	10,3±0,5	1,3±0,9
Pimpinellin	306±0,0	2,0±0,0	3,3±0,9	4,7±1,9	6,5±0,5	0,0±0,0
Phellopterin	314±0,9	3,3±0,0	3,3±0,0	4,0±0,9	6,0±0,9	-0,7±0,0
Psoralen*	296±0,0	2,7±0,9	3,7±2,6	6,7±0,9	7,3±2,5	-0,7±0,9
Sphondin*	302±0,0	4,7±0,5	7,7±1,3	9,5±0,5	10,3±0,5	4,0±0,0
Sphondin	336±1,25		7,3±1,25	8,2±0,5	9,7±0,0	1,0±0,9
Xanthotoxol	314,7±0,9	3,3±0,0	3,3±0,0	4,0±0,9	4,3±1,4	4,7±0,9

*Werte von λ_{\max} möglicherweise nicht exakt; Erläuterungen siehe Text

Isoimperatorin, Oxypeucedanin, Oxypeucedaninhydrat und Sphondin zeigen Rotverschiebungen ihres langwelligsten Absorptionsmaximums in Gegenwart von 100 * 53 μ M DNA_{DS} von über 10 nm, 5-MOP, 8-MOP, 6',7'-Dihydroxybergamottin, Epoxybergamottin, Isopimpinellin und Limettin zwischen 8 – 10 nm, Byakangelicin, Isobergapten, Pimpinellin, Phellopterin und Psoralen zwischen 6 – 8 nm und Angelicin, Imperatorin, Khellin und Xanthotoxol zwischen 3 – 6 nm. Veränderungen von λ_{\max} in Gegenwart von DNA_{SS} können dahingegen nicht beobachtet werden. Lediglich Bergaptol und Coumarin zeigen keinerlei Rotverschiebung in Gegenwart von doppelsträngiger DNA. Da Coumarin nicht zwischen die DNA-Basen interkaliert, was z.B. von Ou et al. (1978) gezeigt wurde, über Bergaptol diesbezüglich keine Daten vorliegen, ist zu überlegen, ob Bergaptol ebenfalls nicht in die DNA interkaliert, was durch keinerlei Änderung der Absorption bei 322 nm in Gegenwart von DNA_{DS} bestätigt werden würde. Da sich allerdings eine Hypochromie bei λ_{\max} = 386 nm zeigt und nach Musajo et al. (1965) die

Löslichkeit von Bergaptol in Gegenwart von DNA_{DS} ansteigt, kann eine mögliche Interkalation nicht ausgeschlossen werden.

In Gegenwart von einzelsträngiger DNA sind bei 8-MOP, Angelicin, Psoralen, Sphondin und Xanthotoxol negative oder stark positive Werte auffällig, die in der gleichen Größenordnung wie bei DNA_{DS} liegen. Ihnen ist aber gemeinsam, dass ihr λ_{\max} in kürzeren Wellenlängenbereichen zu finden ist, bei denen bereits auch DNA absorbiert. Somit können Fehler beim Korrigieren der Spektren um den DNA-Anteil auftreten, was eine Interpretation erschwert.

8-MOP, Angelicin, Byakangelicin, 6',7'-Dihydroxybergamottin, Epoxybergamottin, Limettin, Oxypeucedanin, Oxypeucedaninhydrat, Pimpinellin, Psoralen und Sphondin zeigen eine sehr gute Korrelation zwischen der Abnahme der Absorption und der Rotverschiebung in Abhängigkeit der Konzentration von DNA_{DS}, was bei DNA_{SS} nicht zu beobachten ist. Es ist davon auszugehen, dass dies bei den übrigen Furocumarinen, bei denen eine Bestimmung durch mangelnde Löslichkeit oder eventuelle Fehler aufgrund der erhöhten Viskosität der DNA-Lösung erschwert ist, ebenfalls der Fall ist, weshalb beide Veränderungen als äquivalent angesehen werden.

Somit zeigen fast alle getesteten Furocumarine eine von der DNA_{DS}-Konzentration abhängige Veränderung der Absorption und / oder Wellenlänge von λ_{\max} , was auf Interkalation schließen lässt. Bei den meisten dieser FCs nähern sich diese Effekte innerhalb der getesteten DNA-Konzentrationen einem Plateau, was über den Vergleich mit der Literatur auf ein ähnliches FC-Nucleotid-Verhältnis schließen lässt wie 8-MOP (1:50, (Ou et al. 1978)). Bei Limettin, Khellin und Pimpinellin ist innerhalb der getesteten DNA-Konzentrationen nur ein linearer Zusammenhang feststellbar; das Limettin-Nucleotid-Verhältnis wurde von Ou et al. (1978) auf 1:160 bestimmt. Für Khellin und Pimpinellin lässt sich ein ähnliches Verhältnis vermuten, was aber durch die hier verwendete Methode nicht eindeutig geklärt werden kann. Da die genaue Lage des Plateaus über diese Methode nicht bestimmt werden konnte, ist eine Bestimmung des maximalen FC-Nukleotid-Verhältnisses bzw. der Komplex-Bildungs-Konstante über einen Scatchard-Plot nicht möglich (El-Gogary and El-Gendy 2003); für qualitative Aussagen ist diese High-Throughput-Methode jedoch ausreichend.

Wie bereits unter 6.7.1 ausgeführt, sind die Absorptionswerte von 5-MOP, Isobergapten, Isoimperatorin und Phellopterin aufgrund von unzureichender Löslichkeit nicht verlässlich, doch auch hier kann aufgrund der erhöhten Löslichkeit in Gegenwart von DNA_{DS} ebenfalls auf Interkalation geschlossen werden (Musajo and Rodighiero 1972, Musajo et al. 1965). Lediglich bei Coumarin sind keine DNA_{DS}-konzentrationsabhängigen Veränderungen der Höhe und / oder Wellenlänge von λ_{\max} zu beobachten, was konform mit der Literatur ist (Ou et al. 1978), da dies nicht zwischen die Basen der DNA interkaliert. Auch bei Bergaptol bei $\lambda_{\max} = 322\text{nm}$ sind keine DNA_{DS}-konzentrationsabhängigen Veränderungen von λ_{\max} zu erkennen, wofür die Ursache allerdings nicht geklärt werden konnte, da bei $\lambda_{\max} = 386\text{nm}$ Veränderungen zu erkennen sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle getesteten Furocumarine zur Ausbildung eines DNA-Komplexes fähig sind und somit Unterschiede in ihrer Reaktivität nicht auf eine mangelnde Interkalation zurückzuführen sind.

6.8 Ethidiumbromid- / Hoechst 33258-Kompetitionsassay

Der Ethidiumbromid- und der Hoechst 33258-Verdrängungsassay stellen zwei weitere Methoden dar, die Bindungsaffinität verschiedener Substanzen an die DNA zu überprüfen und die Ergebnisse aus 6.7 zu ergänzen. Hierbei wird die Fähigkeit der untersuchten Furocumarine überprüft, das über die große Furche der DNA interkalierende Ethidiumbromid bzw. den minor groove binder Hoechst 33258 zu verdrängen.

6.8.1 Ethidiumbromid-Kompetitionsassay

Der Assay wurde mit Actinomycin D als Positivkontrolle etabliert. Der EC_{50} -Wert beträgt $1,57 \pm 0,14 \mu\text{M}$ (der zugehörige Graph befindet sich im Anhang) und liegt somit genau im Bereich der Literaturwerte von $1,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ bzw. $1,4 \mu\text{M}$ (Habermeyer 2005, Niederberger 1998). Abb. 6.8.1 zeigt die EtBr-Fluoreszenzintensitäten der getesteten Furocumarine in Prozent relativ zur DMSO-Kontrolle:

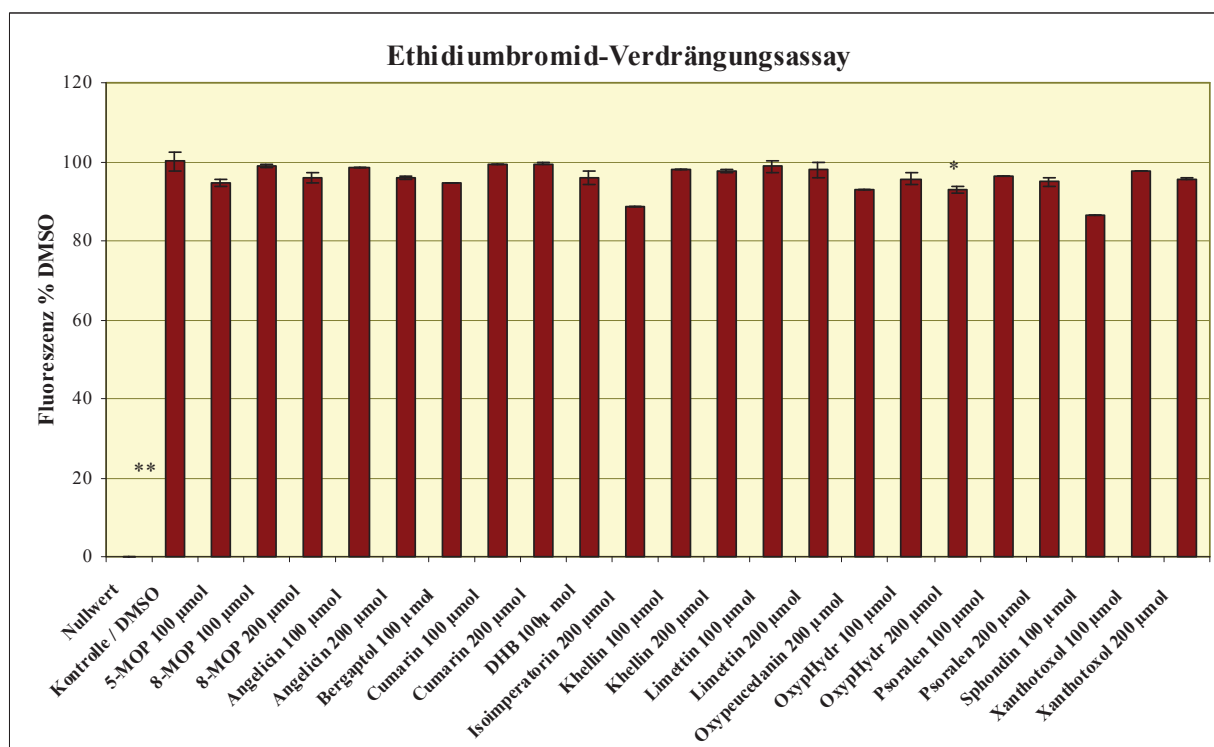


Abb. 6.8.1: Ethidiumbromid-Kompetitionsassay verschiedener Furocumarine, EtBr-Fluoreszenzintensitäten relativ zur DMSO-Kontrolle (n=3; p-value: DMSO vs. Substanz: *one-way ANOVA*+*Dunnnett's post test*, * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$)

Keines der getesteten Furocumarine induziert bis zu einer Konzentration von 200 μM eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität von Ethidiumbromid, d.h. die getesteten FCs sind nicht in der Lage, EtBr aus seinen besetzten Interkalationsstellen zu verdrängen. Somit unterscheiden sie sich nicht von dem zur Kontrolle mitgeführten, nicht-interkalierenden Coumarin. Die durch Isoimperatorin und Sphondin verursachte Verringerung der Fluoreszenz ist aufgrund des wegen geringer Substanzmenge nur einmal durchgeführten Versuchs nicht statistisch aussagekräftig. Weiterhin unterscheidet sich

Oxypeucedaninhydrat (200 μM) vermutlich nur aufgrund der geringen Standardabweichung signifikant von der Kontrolle.

Dies steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu den unter 6.7 gefundenen Ergebnissen, kann aber auf folgende mögliche Ursachen zurückgeführt werden: Ethidiumbromid ist in der Lage, zwischen jedes 4.-5. Basenpaar zu interkalieren (Glazer and Rye 1992), Furocumarine, z.B. 8-MOP, hingegen erreichen ein maximales FC-Nucleotid-Verhältnis von ca. 1:50 (Ou et al. 1978). Zudem zeigt EtBr eine Präferenz für G/C-reiche Regionen (Reinhardt and Krugh 1978), während FCs sich mit leichter A/T-Präferenz bevorzugt in alternierenden Purin- und Pyrimidin-Sequenzen anlagern, wobei FC-Addukte hauptsächlich an Thyminresten zu finden sind (Bordin et al. 1991, Kitamura et al. 2005, Saenz-Méndez et al. 2007). Konkurrieren Ethidiumbromid und ein FC um die gleiche Interkalationsstelle, ist davon auszugehen, dass die Affinität von FC deutlich geringer ausgeprägt ist als die von Ethidiumbromid.

6.8.2 Hoechst 33258-Kompetitionsassay

Der Assay wurde mit Netropsin als Positivkontrolle etabliert. Der EC_{50} -Wert beträgt $0,45 \pm 0,03 \mu\text{M}$ (der zugehörige Graph befindet sich im Anhang) und stimmt somit sehr gut mit den Literaturwerten von $0,36 \pm 0,06 \mu\text{M}$ bzw. $0,4 \mu\text{M}$ überein (Habermeier 2005, Niederberger 1998). Abb. 6.8.2 zeigt die H33258-Fluoreszenzintensitäten der getesteten Furocumarine in Prozent relativ zur DMSO-Kontrolle:

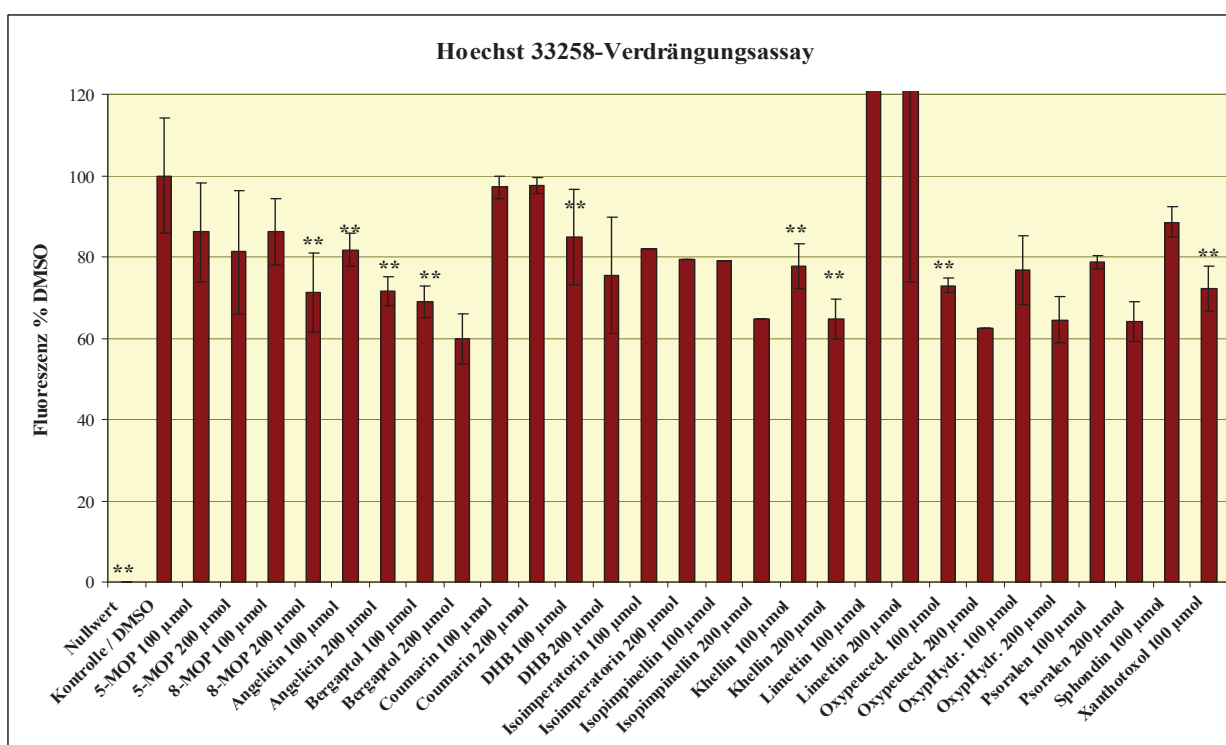


Abb. 6.8.2: Hoechst 33258-Kompetitionsassay verschiedener Furocumarine, H33258-Fluoreszenzintensitäten relativ zur DMSO-Kontrolle ($n=3$; p-value: DMSO vs. Substanz: *one-way ANOVA + Dunnett's post test*, ** $\leq 0,01$)

In Abb. 6.8.2 ist zu erkennen, dass alle Furocumarine, soweit getestet, eine teilweise sehr signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der Fluoreszenz-Intensität (FI) von

0 - 200 μM auf bis zu 60% zeigen (Bergaptol, Khellin, Oxypeucedanin, Oxypeucedaninhydrat, Psoralen, Xanthotoxol, je 200 μM). Das nicht-interkalierende / bindende Coumarin hingegen verursacht wie erwartet keine Verringerung der FI von H33258. Limettin jedoch verursacht eine Erhöhung der Fluoreszenz-Intensität von H33258 auf nahezu 300% (100 μM) bzw. 200% (200 μM) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Dies liegt an der sehr starken Eigenfluoreszenz von Limettin bei diesen Excitations- / Emissions-Wellenlängen von ca. 1500 mAU (100 μM) bzw. 2000 mAU (200 μM) im Vergleich zu der von H33258 von ca. 9 mAU, weshalb möglicherweise eine durch Konkurrenz erzielte FI-Minderung durch die Eigenfluoreszenz verdeckt wird und diese Daten somit nicht verlässlich sind. Ähnliche Überlegungen sind sowohl für Psoralen (100/200 μM) mit ca. 35/50 mAU und Sphondin 100 (μM) mit ca. 75 mAU Eigenfluoreszenz sinnvoll, da so die gemessene Fluoreszenzverminderung über der tatsächlichen, alleine von H33258 ausgehenden liegen könnte und somit Psoralen und Sphondin H33258 in Wirklichkeit noch stärker verdrängen könnten als von den gemessenen FI zu schließen wäre. 8-MOP, Bergaptol, Khellin, Oxypeucedanin und Xanthotoxol, deren hier gemessene Eigenfluoreszenz bei 200 μM zwischen 4-7 mAU schwankt, fungieren vermutlich als Quencher. Somit ist denkbar, dass sie die von H33258 abgestrahlten Photonen absorbieren könnten, weshalb diese nicht mehr vom Photodetektor gemessen werden können, somit die gemessene Fluoreszenzverminderung zu hoch ist und diese FCs H33258 nicht so stark verdrängen wie die FI-Daten nahelegen.

Unter der Annahme hingegen, dass die durch Furocumarine reduzierten FI-Werte tatsächlich durch Verdrängung von H33258 resultieren, ist zu klären, wie diese vonstatten geht. Hoechst 33258 lagert sich etwa alle 100 Basenpaare gewinkelt entlang der DNA-Helix an mindestens vier aufeinanderfolgenden AT-Basenpaare an (Loontjens et al. 1990, Teng et al. 1988). Hierbei ist die Bindung an die kleine Furche A/T-reicher Regionen stark gegenüber der G/C-reicher Regionen favorisiert, da die 2-Aminogruppe des Guanins in die Furche ragt und ein Anlagern des Farbstoffs verhindert (Bailly et al. 1993). Diese Autoren diskutierten ein weiteres Bindungsmodell von H33258 an die DNA, bei dem der Farbstoff teilweise zwischen die Basen in G/C-reichen Regionen interkaliert, teilweise in die große Furche ragt. Interkaliert das freie H33258 in G/C-reiche Regionen, ist dessen Fluoreszenzerhöhung jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt als bei der Bindung in A/T-reiche Regionen (Loontjens et al. 1990), wodurch zu schließen ist, dass die Verdrängung von H33258 aus der kleinen Furche A/T-reicher Regionen die Hauptursache für beobachtete Verminderungen der Fluoreszenzintensität ist. Aus theoretischen Studien an Psoralen wurde geschlossen, dass für FCs nicht nur zwischen die Basen der DNA mit einer gewissen A/T-Präferenz interkalieren, sondern auch an die kleine Furche binden (Saenz-Méndez et al. 2007). Daher kann die Interkalation von FCs zwischen die Basen in G/C-reichen als Ursache für die beobachtete FI-Verminderung vernachlässigt werden. Eine Interkalation von H33258 zwischen die DNA-Basen in A/T-reichen Regionen wurde als sehr schwach beschrieben; hier ist klar die Bindung an die kleine Furche bevorzugt (Bailly et al. 1993). Auch wenn bis zu 30% der FCs an die DNA-Oberfläche binden, ist gerade in A/T-reichen Regionen die Interkalation von Furocumarinen gegenüber der Bindung an die kleine Furche bevorzugt (Saenz-Méndez et al. 2007); dennoch scheint die Bindungsaffinität der FCs an die kleine Furche ausreichend ausgeprägt zu sein, um das sehr affine H33258 teilweise zu verdrängen. Weiterhin könnten möglicherweise auch zwischen zwei Basenpaare interkalierte FCs zu minimalen strukturellen oder elektronischen Veränderungen der von H33258 bevorzugten Bindungsstellen führen,

aufgrund derer der Fluoreszenzfarbstoff wieder dissoziiert und somit eine Verringerung der Fluoreszenz-Intensität verursacht. Dies kann durch diesen Versuchsaufbau nicht eindeutig geklärt werden; dennoch kann festgehalten werden, dass alle in diesem Assay getesteten Furocumarine in der Lage sind, mit der DNA zu interagieren, was somit nicht die Ursache für die unter 6.3-5 gefundenen Reaktivitätsunterschiede ist.

6.9 Photoproduktion reaktiver Sauerstoffspezies

Zur Überprüfung, ob neben der DNA auch noch andere Targets der photoaktivierten Furocumarine berücksichtigt werden müssen oder noch andere DNA-Schäden als FC-Monoaddukte oder Crosslinks auftreten könnten, wurden in diesem Kapitel Furocumarine auf ihre möglicherweise unterschiedlich ausgeprägte Fähigkeit hin untersucht, in Kombination mit UVA-Licht Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und Superoxidradikalanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) bilden zu können. Gezeigt werden im Folgenden der vollständige UVA-dosisabhängige Verlauf der $^1\text{O}_2$ - bzw. $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildung durch FCs und zur besseren Vergleichbarkeit die relativen Absorptionswerte nach der Applikation der ausgewählten Strahlungsdosen von 10 und 25 J/cm^2 .

6.9.1 Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)

Die Abbildungen 6.9.1a und 6.9.1b zeigen die Photoproduktion von $^1\text{O}_2$ verschiedener Furocumarine durch UVA-Strahlung, indirekt gemessen über die Abnahme der Absorption bei 440 nm und somit Entfärbung von *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin:

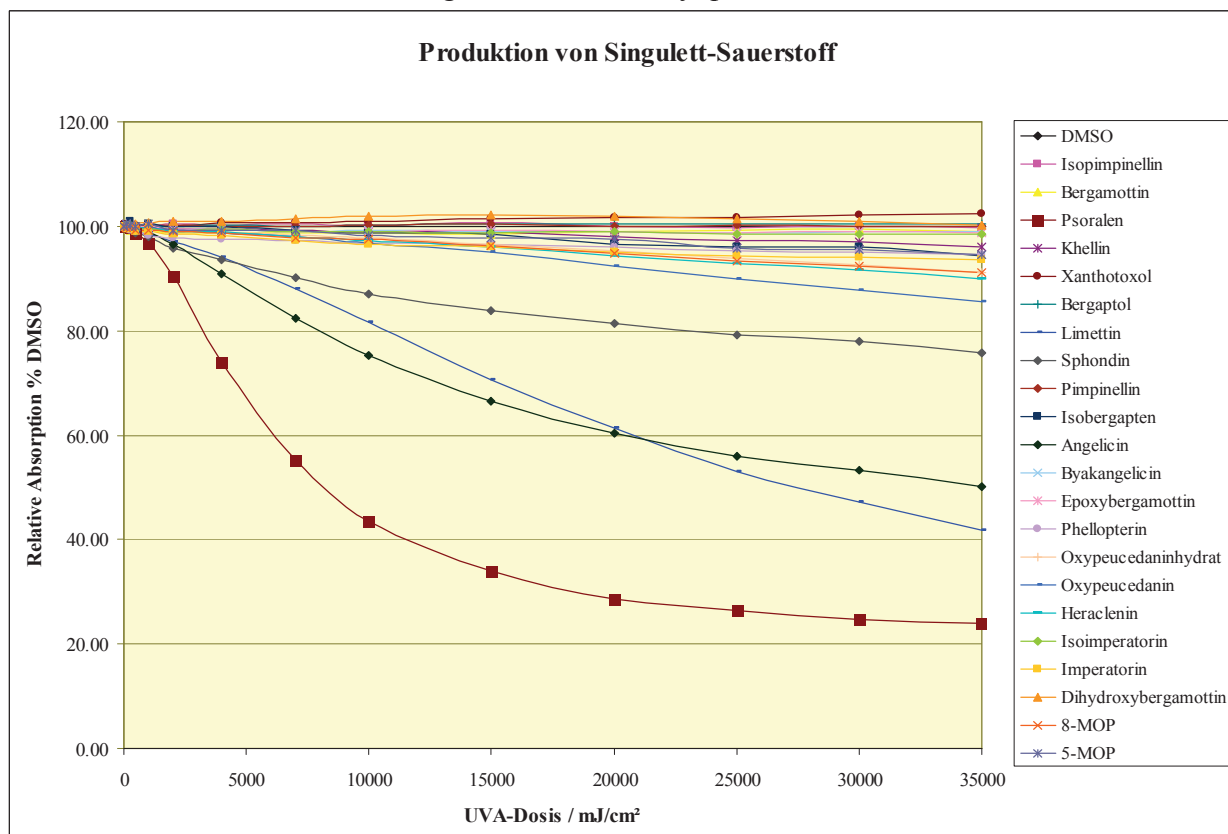


Abb. 6.9.1a: UVA-Dosis-abhängiger Verlauf der Photoproduktion von $^1\text{O}_2$ durch verschiedene Furocumarine; dargestellt sind die Absorptionswerte von *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin bei 440 nm relativ zur DMSO-Kontrolle (n=3)

Die Absorptionswerte von *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin der Positivkontrolle Psoralen fallen von den getesteten Verbindungen am stärksten zunächst näherungsweise linear bis zu einer UVA-Dosis von etwa 10 J/cm² ab und nähern sich dann mit zunehmender UVA-Dosis im getesteten Bereich asymptotisch einer relativen Absorption von etwa 23%. Der Verlauf der Absorptionsabnahme ähnelt somit stark dem einer Reaktion 1. Ordnung. Auch die Absorptionswerte bei Angelicin und Sphondin folgen einem ähnlichen Verlauf, fallen allerdings nicht derart stark ab; ein möglicher Endwert wie bei Psoralen kann allerdings im getesteten UVA-Dosisbereich nicht abgeschätzt werden. Ein derartiger Verlauf der Absorptionsabnahme ist entweder auf eine mögliche Photolyse des Psoralens (Caffieri 2002) zurückzuführen oder auf eine verminderte Treffer- / Reaktions-Wahrscheinlichkeit des gebildeten ¹O₂ auf / mit dem nun geringer vorhandenen *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin. Die Absorptionswerte bei allen anderen Furocumarinen nehmen im getesteten Bereich nur minimal ab, zeigen ähnliche oder die gleichen Absorptionswerte wie die Lösemittelkontrolle DMSO.

Auffällig ist jedoch die Überschneidung der zwischen der der Kontrollen Psoralen und DMSO liegenden Graphen von Angelicin und Limettin; letzterer folgt einem nahezu linearen Verlauf im gesamten getesteten UVA-Dosisbereich bis 35 J/cm², ersterer zeigt einen leicht kurvenförmigen Verlauf ähnlich dem des Psoralens. Da beide Graphen sich im gleichen Absorptionsbereich von *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin befinden und somit die gleiche Menge des Farbstoffs zur Entfärbung durch ¹O₂ zur Verfügung steht, ist zu schließen, dass eine unterschiedliche Menge Limettin und Angelicin zur Reaktion zur Verfügung stehen, d.h. die eingesetzte FC-Menge nicht als konstant betrachtet werden kann und die Entfärbungsreaktion nicht allein von der Menge des verbleibenden Farbstoffs abhängig ist. Es kann gefolgert werden, dass der zugrundeliegende Effekt die unterschiedliche Photostabilität der Substanzen ist und somit Angelicin stärker zur Photolyse (z.B. Dimerbildung, Oxidation) als Limettin neigt. So kann auch erklärt werden, weshalb sich der Absorptionsverlauf einem festen Wert ungleich Null annähert, z.B. bei Psoralen etwa 23%: Nach Applikation einer bestimmten UVA-Dosis wurden die eingesetzten Furocumarinmoleküle vermutlich vollständig zerstört.

Zur besseren Quantifizierung des Potentials der FCs zur Photoproduktion von ¹O₂ zeigt Abb. 6.9.1b die relativen Absorptionswerte nach einer UVA-Dosis von 10 & 25 mJ/cm²:

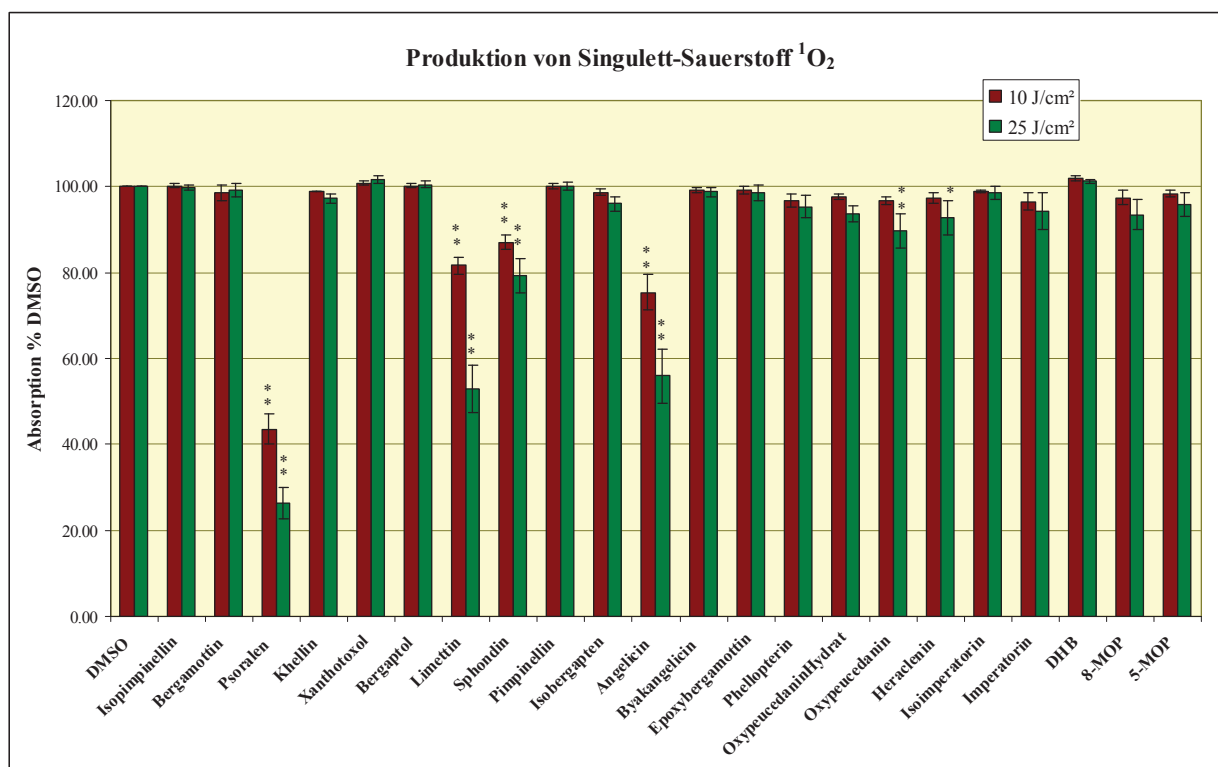


Abb. 6.9.1b: Photoproduktion von $^1\text{O}_2$ durch verschiedene Furocumarine durch eine UVA-Dosis von 10 & 25 J/cm²; dargestellt sind die Absorptionswerte von *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin bei 440 nm relativ zur DMSO-Kontrolle (n=3; p-value: DMSO vs. Substanz: *one-way* ANOVA+*Dunnnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01)

Psoralen, Angelicin, Limettin und Sphondin zeigen schon nach einer UVA-Dosis von 10 J/cm² eine sehr signifikante Abnahme der Absorption im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, Oxypeucedanin jedoch erst nach einer Dosis von 25 J/cm². Bei dieser Dosis ist bei Heraclenin auch nur ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die Absorptionswerte aller anderen Furocumarine unterscheiden sich jedoch im getesteten Dosisbereich nicht signifikant von der Negativkontrolle. Eine Ausnahme bilden Oxypeucedaninhydrat und 8-MOP nach Applikation von 35 J/cm² (nicht gezeigt). Somit ergibt sich aus Abb. 6.9.1b folgende Reihenfolge für die Menge des photochemisch gebildeten $^1\text{O}_2$ nach einer UVA-Dosis von 25 mJ/cm²:

Psoralen >> Limettin > Angelicin >> Sphondin >> Oxypeucedanin > Heraclenin > 8-MOP > Oxypeucedaninhydrat > Imperatorin > Phellopterin ≈ 5-MOP ≈ Isobergaptin > Khellin > Isoimperatorin ≈ Epoxybergamottin ≈ Byakangelicin > Bergamottin ≈ Isopimpinellin > DMSO > Pimpinellin ≈ Bergaptol > DHB ≈ Xanthotoxol.

Vergleiche mit der Literatur sind aufgrund mangelnder Datenlage und variabler Strahlungsquellen nur vereinzelt möglich: Joshi und Pathak fanden (1983 & 1984) die Reihenfolge Psoralen > Angelicin > 8-MOP > 5-MOP, analog zu Krasnovskii et al. (1983) oder Carraro et al. (1987) mit Psoralen > Angelicin > 8-MOP oder Decuyper et al. (1983) mit Angelicin > 8-MOP > 5-MOP, welche mit den hier gefundenen Ergebnissen übereinstimmt. Cannistraro und Van de Vorst (1977) zeigten, dass die Bildung freier Radikale an Thyminbasen durch $^1\text{O}_2$ in der Reihenfolge Psoralen > Angelicin > 8-MOP > 5-MOP abnahm, während Bergaptol und Xanthotoxol völlig inaktiv waren. Ebenso fanden Martelli et al. (1985) keine $^1\text{O}_2$ -Produktion durch Khellin.

6.9.2 Photoproduktion von Superoxidradikalanionen ($O_2^{\cdot-}$)

Die Abbildungen 6.9.2a und 6.9.2b zeigen die Photoproduktion von $O_2^{\cdot-}$ verschiedener Furocumarine und von Riboflavin durch UVA-Strahlung, indirekt gemessen über die Reduktion des gelben Farbstoffs Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid (NBT) zu dem blauen Formazan (FMZ) und somit eine Absorptionszunahme bei 560 nm:

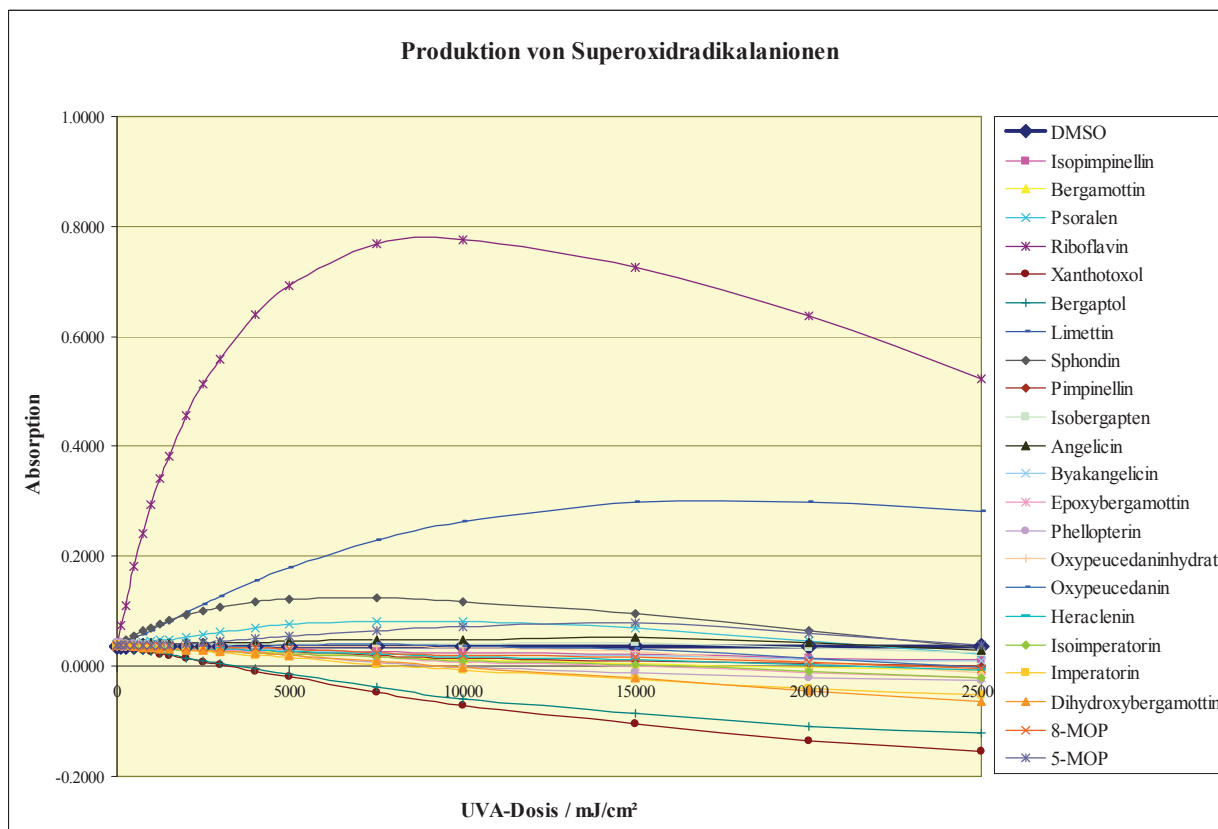


Abb. 6.9.2a: UVA-dosisabhängiger Verlauf der Photoproduktion von $O_2^{\cdot-}$ durch verschiedene Furocumarine; dargestellt sind die Absorptionswerte (560 nm) des reduzierten Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorids (Formazan) relativ zur DMSO-Kontrolle (n=3)

Die Bildung des Formazans bzw. die gemessene Absorption steigt bei der Positivkontrolle Riboflavin am stärksten zunächst bis zu einer UVA-Dosis von 2 J/cm² nahezu linear an, steigt stetig nichtlinear bis etwa 8,5 J/cm² weiter und fällt im weiteren Verlauf wieder ab. Dieser Abfall der Absorption ist bei allen (Furo-)cumarinen zu verzeichnen, bei denen zunächst ein Anstieg der Absorption im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet wird, und lässt auf eine Photolyse des gebildeten Formazans schließen. Weiterhin zu beobachten ist der unter allen FCs größte und zunächst bei beiden etwa gleich starke Anstieg der Absorption bei Limettin und Sphondin bis 2 J/cm², der dann bei Sphondin schwächer ansteigt und dann bei etwa 7,5 J/cm² (Limettin: ca. 18 J/cm²) wieder rückläufig ist. Diese Rückläufigkeit der Absorption ist analog zu der unter 6.9.1 beobachteten, schwächer abfallenden Absorption mit Limettin und Angelicin und lässt auf eine unterschiedliche Photostabilität schließen, wobei Sphondin eher zur Photolyse neigt. Ein Beispiel unterschiedlicher FC-Photo-Degradation beschrieben Uesawa und Mohri (2006): In UV-bestrahltem ($\lambda_{\max} = 302$ nm) Grapefruitsaft fanden sie eine mind. 3-fach schnellere vollständige Zerstörung von DHB und Bergamottin nach einer Dosis von ca. 35 J/cm² im

Vergleich zu Bergaptol. Deshalb kann bei $\lambda_{\max} = 365 \text{ nm}$ für alle hier getesteten Furocumarine eine unterschiedliche Photodegradation angenommen werden.

Die meisten Furocumarine zeigen allerdings Absorptionswerte im Bereich der DMSO-Kontrolle. Besonders stark bei Xanthotoxol und Bergaptol, weniger stark ausgeprägt auch bei DHB und Imperatorin, ist ein zunächst stärkerer, später schwächer werdender Abfall der Absorption im Vergleich zu DMSO zu beobachten. Die negativen Absorptionswerte kommen dabei artifiziell durch die Auswertung zustande, da hier die L-Methionin-vermittelte Reduktion von NBT verrechnet wurde. So kann geschlossen werden, dass diese Substanzen nicht nur sehr schwache bzw. keine Photoproduzenten von $\text{O}_2^{\cdot-}$ sind, sondern auch noch in der Lage sind, die möglicherweise von DMSO gebildeten $\text{O}_2^{\cdot-}$ bzw. von L-Methionin abgegebenen Elektronen abzufangen. Dies konnte schon von Prasad et al. (2009) an Xanthotoxol gezeigt werden und ist auf die phenolische Hydroxygruppe zurückzuführen (Siddhuraju, Mohan and Becker 2002). Negative Ladungen eines Phenolat-Anions können in aromatischen Systemen sehr gut mesomeriestabilisiert werden, was analog für Bergaptol gilt.

Zur besseren Quantifizierung des Potentials der FCs zur Photoproduktion von $\text{O}_2^{\cdot-}$ zeigt Abb. 6.9.2b die Absorptionswerte nach einer applizierten UVA-Dosis von 10 & 25 mJ/cm^2 :

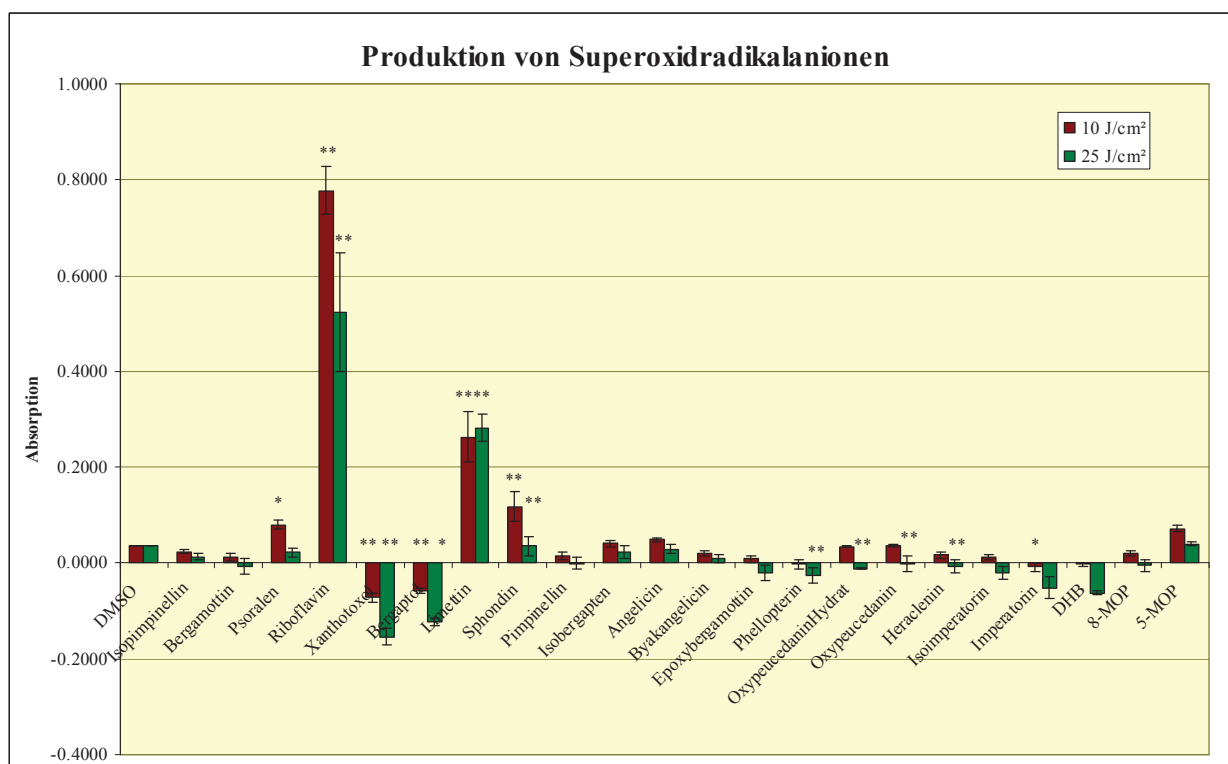


Abb. 6.9.2b: Photoproduktion von $\text{O}_2^{\cdot-}$ durch verschiedene Furocumarine durch eine UVA-Dosis von 10 & 25 J/cm^2 ; dargestellt sind die Absorptionswerte des reduzierten Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorids (Formazan) relativ zur DMSO-Kontrolle ($n=3$; p-value: DMSO vs. Substanz: *one-way ANOVA*+*Dunnnett's post test*, * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$)

Nach einer Applikation einer UVA-Dosis von 10 J/cm^2 zeigen Riboflavin, Limettin und Sphondin sehr signifikante, Psoralen signifikante Unterschiede bei den Absorptionswerten größer denen der DMSO-Kontrolle, Xanthotoxol und Bergaptol weichen hingegen sehr signifikant, Imperatorin signifikant ab in Wertebereiche kleiner der der DMSO-Kontrolle.

Nach Applikation von 25 J/cm² weichen die Werte von Riboflavin, Limettin und Sphondin sehr signifikant in den Bereich größerer Absorptionswerte im Vergleich zu DMSO ab, Xanthotoxol, Limettin, Phellopterin, Oxypeucedanin, Oxypeucedaninhydrat und Heraclenin weichen sehr signifikant in den Bereich kleinerer Werte im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle ab. Die Absorptionswerte aller anderen Furocumarine unterscheiden sich jedoch im getesteten Dosisbereich nicht signifikant von der Negativkontrolle.

Somit ergibt sich aus Abb. 6.9.2b folgende Reihenfolge für die Menge des photochemisch gebildeten O₂^{•-} bzw. zum Abfangen der gebildeten O₂^{•-} und/oder e⁻ nach einer UVA-Dosis von 10 mJ/cm²:

Riboflavin >> Limettin > Sphondin > Psoralen > 5-MOP > Angelicin > Isobergapten > DMSO ≈ Oxypeucedanin ≈ Oxypeucedaninhydrat > Isopimpinellin > Byakangelicin ≈ 8-MOP > Heraclenin > Pimpinellin > Bergamottin ≈ Isoimperatorin > Epoxybergamottin > Phellopterin ≈ DHB > Imperatorin > Bergaptol > Xanthotoxol.

Nach 25 J/cm² ändert sich diese Reihenfolge auf:

Riboflavin >> Limettin > 5-MOP > DMSO > Sphondin > Angelicin > Isobergapten > Psoralen > Isopimpinellin > Byakangelicin > Pimpinellin ≈ Oxypeucedanin > 8-MOP > Bergamottin ≈ Heraclenin > Oxypeucedaninhydrat > Epoxybergamottin ≈ Isoimperatorin > Phellopterin > Imperatorin > DHB > Bergaptol > Xanthotoxol.

Aufgrund der fortschreitenden Zerstörung des Formazans und der Furocumarine mit steigender UVA-Dosis wird im Folgenden die Reihenfolge bei 10 J/cm² als relevanter angesehen.

Joshi und Pathak fanden nach einer finalen UVA-Dosis von 2,2 J/cm² im gleichen Testsystem die Reihenfolge Riboflavin > Psoralen > Angelicin > 8-MOP > 5-MOP, die nicht vollständig mit der in dieser Arbeit festgestellten Reihenfolge, nämlich Riboflavin > Psoralen > Angelicin = 5-MOP > 8-MOP, nach Bestrahlung mit 10 J/cm² übereinstimmt. Carraro und Pathak bestimmten die O₂^{•-}-Bildungsrate und kamen zu der Reihenfolge Riboflavin >> Psoralen > 8-MOP > Angelicin, was auch bis auf 8-MOP der in dieser Arbeit gefundenen entspricht (Pathak and Joshi 1984, Carraro and Pathak 1988, Joshi and Pathak 1983).

Inwieweit diese Ergebnisse die Annahme einer strikten Dosis-Additivität in den zellbasierten Assays beeinflussen können wird, genau wie eine mögliche Relevanz für *in vivo*-Situationen, nachfolgend diskutiert (Kap. 7).

7 Diskussion

Furocumarine sind natürlich vorkommende Substanzen, die von einigen Pflanzen als Phytoalexine als Reaktion auf Stressereignisse gebildet werden, darunter auch einige Obst- und Gemüsesorten wie Limetten oder Sellerie, wodurch auch eine menschliche Exposition zustande kommt (SKLM 2006). Fast immer findet sich nicht nur ein einziges Furocumarinderivat in der Pflanze, vielmehr sind natürlich vorkommende Furocumarinemische die Regel, deren einzelne Komponenten sich jedoch in der Ausprägung ihrer Eigenschaften stark unterscheiden können (Musajo and Rodighiero 1972). Zur detaillierten toxikologischen Charakterisierung und Bewertung dieser Gemische ist daher nicht nur die Kenntnis der möglichen (adversen) Effekte der Einzelkomponenten essentiell, sondern auch die des Verhaltens der einzelnen Furocumarine in einer Mischung und möglicher Wechselwirkungen, wodurch sich gegebenenfalls Abweichungen von der einfachen Additivität der Einzelwirkungen ergeben könnten.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der photochemisch induzierten Eigenschaften von Furocumarinen. Die bereits vielfach auch an V79-Zellen in der Literatur gezeigten Eigenschaften wie Phototoxizität (Papadopoulos and Averbeck 1985), Photomutagenität im HPRT-Assay (Burger and Simons 1979, Papadopoulos and Averbeck 1985) oder Photoclastogenität im Mikrokernstest (Kersten et al. 2002, Kersten et al. 1999) konnten hier ebenfalls an vielen FC-Derivaten in variabler Ausprägung gezeigt werden, während andere unter den gewählten Versuchsbedingungen völlig inaktiv waren. Auch die unterschiedlich ausgeprägte Fähigkeit von Furocumarinen zur Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff und Superoxidradikalanionen (Joshi and Pathak 1983) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Ebenso konnte unter 6.6-6.8 aufgezeigt werden, dass alle Furocumarine in stark ähnlichen Wellenlängenbereichen absorbieren und zudem in ähnlichem, wenn auch nicht exakt quantifiziertem Maße in die DNA interkalieren; weiterhin ist bei allen keine Verdrängung von Ethidiumbromid zu verzeichnen und nur eine schwache Konkurrenz mit Hoechst 33258 in hohen FC-Konzentrationsbereichen. Da somit weder Absorption und noch Interaktion mit der DNA unter allen Furocumarinen nicht stark genug variieren, um mögliche Reaktivitätsunterschiede der FCs zu erklären und damit ausführlich genug unter 6.6-6.8 besprochen wurden, soll darauf im weiteren Verlauf der Diskussion nicht mehr eingegangen werden.

Die meisten Literaturquellen zur Phototoxizität und Photogenotoxizität der Furocumarine befassen sich mit den in der PUVA-Therapie eingesetzten FCs wie 8-MOP, Psoralen oder 5-MOP, an Hand derer die Eigenschaften von Furocumarinen verallgemeinert dargestellt werden. Daher soll im ersten Teil der Diskussion auf die mitunter unterschiedlich ausgeprägten Eigenschaften der einzelnen Derivate eingegangen werden und die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit dem aktuellen Stand der Forschung verglichen werden, wobei hier gewisse Varianzen allein aufgrund der unterschiedlichen Strahlungsquellen auftreten können.

In Tab. 7 sind alle in dieser Arbeit bestimmten Parameter aller Furocumarine und Limettin noch einmal zusammenfassend gegenübergestellt:

Diskussion

Tab. 7: Übersicht und Zusammenfassung der in dieser Arbeit bestimmten Ergebnisse

Furocumarin	Struktur	EC ₅₀ ^b / PTEF	EC _{50,μM} / PTEF _{μM}	PMEF ^b	PMEF _{μM}	PCEF ^b	PCEF _{μM}	Inter- kalation ^c	Prod. ^d ¹ O ₂	Prod. ^e O ₂ ^{•-}	logP ^f	logS ^g (mol/l)
5-MOP		3,3 / 1,000	15,5 / 1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ja	98 / 96	0,072 / 0,040	2,24 / 2,00 ^h / 2,41 ⁱ	-3,55
8-MOP		17,0 / 0,197	78,6 / 0,197	0,240	0,240	0,163	0,163	ja	97 / 93	0,020 / -0,005	2,24 / 1,93 ^h / 1,93 ⁱ	-3,55
Angelicin		(227,0 / 0,015)	(1219,3 / 0,013)	0,033	0,028	0,004	0,003	ja	75 / 56	0,049 / 0,029	2,34 / 1,99 ⁱ	-3,53
Bergamottin ^a		n.d.	n.d.	0,005	0,008	0,001	0,002	n.d.	99 / 99	0,012 / -0,007	5,69	-5,26
Bergaptol		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	ja	100 / 101	-0,059 / -0,122	2,04	-3,23
Byakangelicin		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	ja	99 / 99	0,020 / 0,009	1,72	-3,7
Coumarin ^a		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	nein	n.b.	n.b.	1,95	-2,37
6',7'- Dihydroxy- bergamottin		30,1 / 0,111	80,9 / 0,191	0,034	0,058	0,149	0,256	ja	102 / 101	-0,003 / -0,063	3,7	-4,67
Epoxy- bergamottin		18,7 / 0,179	52,7 / 0,294	0,033	0,054	0,084	0,137	ja	99 / 99	0,008 / -0,020	4,42	-5,16

Furocumarin	Struktur	EC ₅₀ ^b / PTEF	EC _{50,µM} / PTEF _{µM}	PMEF ^b	PMEF _{µM}	PCEF ^b	PCEF _{µM}	Inter- kalation ^c	Prod. ^d ¹ O ₂	Prod. ^e O ₂ ^{-•}	logP ^f	logS ^g (mol/l)
Heraclenin		56,7 / 0,059	198,2 / 0,078	0,047	0,063	0,031	0,041	ja	97 / 93	0,016 / -0,008	2,45	-4,18
Imperatorin		21,7 / 0,154	80,3 / 0,193	0,100	0,125	0,066	0,083	ja	97 / 94	-0,008 / -0,051	3,72	-4,28
Isobergapten		n.d.	n.d.	Erreichen e. Plateaus ab ca. 15 µg/ml bis MF ca. 60*10 ⁻⁶		0,001	0,001	ja	99 / 96	0,040 / 0,024	2,24	-3,55
Isoimperatorin		(178,9 / 0,019)	(662,0 / 0,023)	0,008	0,009	Erreichen e. Plateaus ab 10 µg/ml bei 110*10 ⁻³ MNZ		ja	99 / 99	0,011 / -0,020	3,72	-4,28
Isopimpinellin ^a		n.d.	n.d.	0,003	0,003	n.d.	n.d.	ja	100 / 100	0,024 / 0,013	2,13	-3,56
Khellin		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	ja	99 / 97	n.b.	2,69	-4,11
Limettin		73,7 / 0,045	357,5 / 0,043	0,023	0,022	0,004	0,004	ja	82 / 53	0,263 / 0,282	1,74	-2,41

Diskussion

Furocumarin	Struktur	EC ₅₀ ^b / PTEF	EC _{50,µM} / PTEF _{µM}	PMEF ^b	PMEF _{µM}	PCEF ^b	PCEF _{µM}	Inter- kalation ^c	Prod. ^d ¹ O ₂	Prod. ^e O ₂ ^{•-}	logP ^f	logS ^g (mol/l)
Oxypeucedanin		9,6 / 0,350	33,4 / 0,463	0,059	0,078	0,119	0,157	ja	97 / 90	0,036 / -0,001	2,45	-4,18
Oxypeucedanin- hydrat		21,2 / 0,158	69,4 / 0,222	0,048	0,068	0,121	0,170	ja	98 / 94	0,034 / -0,012	1,72	-3,7
Pimpinellin		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	ja	100 / 100	0,014 / 0	2,13	-3,56
Phellopterin		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	ja	97 / 95	-0,002 / -0,026	3,61	-4,3
Psoralen ^a		12,0 / 0,278	64,5 / 0,240	0,320	0,275	0,162	0,140	ja	44 / 26	0,080 / 0,022	2,34 / 1,97 ⁱ	-3,53
Sphondin		45,0 / 0,074	208,0 / 0,074	0,088	0,088	0,015	0,015	ja	87 / 79	0,117 / 0,035	2,24	-3,55
Xanthotoxol		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	ja	101 / 102	-0,072 / -0,155	2,04	-3,23

a = Literaturdaten, berechnet aus (Lohr 2009, Lohr, Raquet und Schrenk 2010); b = Einheit µg/ml; c = abgeleitet aus der Hypochromie und Rotverschiebung aus 6.7.1&2; d = Produktion von ¹O₂, dargestellt als Bleichung von *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin in % DMSO nach einer Dosis von 10/25 J/cm²; e = Produktion von O₂^{•-}, dargestellt als absolute Absorption in mAU des NBT-Formazans nach einer Dosis von 10/25 J/cm² (Riboflavin: 0,777 / 0,524); f = logP, logarithmierter Verteilungskoeffizient einer Substanz in einem n-Oktan-Wasser-Gemisch, log(Konz._{Okta}/Konz._{Wasser}); g = logS, logarithmierte Löslichkeit der Substanz in Wasser in mol/l; f&g berechnet über OSIRIS Property Explorer; h aus (Mary et al. 1998); i aus (Caffieri 2001); n.d. = nicht detektierbar; n.b. = nicht bestimmt

Bei den in Tab. 7 aufgeführten Werten handelt es sich um die in dieser Arbeit bestimmten PXEF-Werte (Ausnahme: Bergamottin, Isopimpinellin, Psoralen aus (Lohr 2009, Lohr et al. 2010)), die Interkalation wurde abgeleitet aus der Hypochromie und Rotverschiebung aus 6.7.1 und 6.7.2. Die Produktion von $^1\text{O}_2$ ist dargestellt als Bleichung von *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin in % der Lösemittelkontrolle DMSO, die Produktion von $\text{O}_2^{\cdot -}$ als absolute Absorption in mAU des NBT-Formazans nach einer Dosis von 10 bzw. 25 J/cm², die Werte der Positivkontrolle Riboflavin betragen dabei 0,777 bzw. 0,524 mAU. Die hier aufgeführten Werte von logP (logarithmierter Verteilungskoeffizient einer Substanz in einem n-Oktanol-Wasser-Gemisch, $\log(\text{Konz.}_{\text{Oktanol}}/\text{Konz.}_{\text{Wasser}})$) und logS (logarithmierte Löslichkeit der Substanz in Wasser in mol/l) wurden nicht experimentell bestimmt, sondern über das Programm OSIRIS Property Explorer berechnet. Zwar sind geringfügige Diskrepanzen zwischen den berechneten Werten und den wenigen verfügbaren Literaturdaten (Caffieri 2001, Mary et al. 1998) zu erkennen, dennoch stimmt der allgemeine Trend mit den während des Lösens der Reinsubstanzen im Zellkulturmedium gemachten Beobachtungen recht gut überein.

Im weiteren Verlauf der Diskussion soll auf die in den Zellkulturexperimenten beobachteten Effekte der Mischungen näher eingegangen werden, um so Rückschlüsse auf die Anwendbarkeit des vorgestellten PXEF-Konzepts ziehen zu können. Dabei wird auch auf Faktoren eingegangen, die bei der Anwendung des Konzepts als einfaches Werkzeug zur Beurteilung komplexer, natürlich vorkommender Furocumarinmischungen bei der Übertragung auf eine *in vivo*-Situation berücksichtigt werden müssen.

Allgemein kann festgehalten werden, dass alle photogentoxischen Furocumarine mit steigender Konzentration oder höherer UVA-Dosis auch zunehmend phototoxische Effekte verursachen, weshalb die PMEF- und PCEF-Werte nur über niedrigere FC-Konzentrationen erstellt werden konnten, wohingegen generell nicht von Zytotoxizität auf Gentoxizität geschlossen werden kann (Kersten et al. 2002).

7.1 Einzelbetrachtung der Furocumarine

Im Folgenden sollen die gefundenen Ergebnisse für jede untersuchte Verbindung einzeln diskutiert werden. Ein direkter Literaturvergleich gestaltet sich allerdings äußerst schwierig, da diese Daten äußerst inhomogen aus verschiedenen sehr unterschiedlichen Testsystemen (*in vitro*, *in vivo*, Algen, Hefen, Bakterien, Zelllinien, Meerschweinchen, Mäuse, Humandaten...) gewonnen wurden und oft nur einzelne Furocumarine untersucht wurden. Weiterhin sind häufig lediglich die in der PUVA-Therapie eingesetzten FCs photochemisch untersucht, Daten zur Photochemie anderer Furocumarine wie DHB sind sehr lückenhaft oder gar nicht vorhanden, ebenso wie das exakte Emissionsspektrum der Strahlungsquelle oder die Dosis. Zudem gestaltet sich die Bewertung der Ergebnisse ohne Bestrahlung schwierig, da meist keine Angaben über Lichtausschluss gemacht wurden und so die Qualität der Daten nicht gesichert ist, da einige Effekte ebenso versehentlich photochemisch induziert gewesen sein könnten.

5-MOP:

Unter den gewählten Bedingungen mit der standardisierten UVA-Dosis von 125 mJ/cm² zeigte 5-MOP von allen getesteten natürlich vorkommenden Furocumarinen das größte phototoxische, photomutagene und photoclastogene Potential, in Abwesenheit von UVA-Licht sind keine Effekte zu verzeichnen. Dies ist in Kongruenz mit vielen Literaturstellen:

Eine Reduktion der Vitalität von V79-Zellen nach Inkubation mit 5 µM 5-MOP auf 50% fand Papadopoulos bereits nach einer Bestrahlung mit ca. 90 mJ/cm², bestimmt über die Plating Efficiency nach 7 d. Die in dieser Arbeit gefunden EC₅₀-Werte von 33,8 µM bzw. 18,4 µM bei einer UVA-Dosis von 75 bzw. 100 mJ/cm² nach 3 d sind zwar größer als die Werte von Papadopoulos, können aber aufgrund der unterschiedlichen Vitalitätsbestimmung und Nachinkubationszeit als etwa äquivalent angesehen werden (Papadopoulos and Auerbeck 1985). Im Vergleich mit 8-MOP stellte sich auch bei Papadopoulos 5-MOP als phototoxischer heraus, da bei einer Konzentration von 5 µM für eine Reduktion der Vitalität auf 50% bei 8-MOP eine UVA-Dosis von 225 mJ/cm² benötigt wurde. Bei 5-MOP waren etwa 90 mJ/cm² ausreichend.

In verschiedenen reparaturdefizienten *E. coli*-Stämmen bzw. diploider Hefe (*S. cerevisiae*) ist 5-MOP phototoxischer als 8-MOP (Pool, Klein and Deutsch-Wenzel 1982, Auerbeck, Dardalhon and Magana-Schwencke 1990c). Schimmer zeigte bei arg⁻ Mutanten von *Chlamydomonas reinhardtii* ein konzentrationsabhängiges größeres phototoxisches und -mutagenes Potential von 5-MOP im Vergleich zu 8-MOP (Schimmer 1981), was analog zu den Ergebnissen von Auerbeck et al. in *S. cerevisiae* ist (Auerbeck et al. 1990b).

Loveday konnte in CHO-Zellen in Kombination mit UVA-Licht SCEs und Mutationen im *hprt*-Lokus induzieren, was ohne UVA-Licht nicht gelang (Loveday and Donahue 1984). In arg⁻ Mutanten von *C. reinhardtii* zeigte 5-MOP nach Bestrahlung mit 360 mJ/cm² UVA eine konzentrationsabhängige Zunahme der Revertanten. Bei einer Konzentration von 5 µg/ml fanden die Autoren 887, 102 und 42 * 10⁸ Revertanten bei 5-MOP, Psoralen bzw. Imperatorin, was in deren Versuchsaufbau PMEFs von 1, 0,11 und 0,05 entspricht und die gleiche Tendenz wie die hier gefundenen Werte (1, 0,32 und 0,10) aufweist (Schimmer and Kühne 1990).

Kersten et al. fanden nach einer Bestrahlung von V79-Zellen mit einer UVA/UVB-Dosis von 400/10 mJ/cm² nach einer halbstündigen FC-Inkubation ein Maximum des Anteils mikrokerntragender Zellen von je 38% bei 10⁻⁷ M 5-MOP bzw. 10⁻⁶ M 8-MOP und einen maximalen Anteil von 26% bei 3*10⁻⁵ M Angelicin, was in deren Versuchsanordnung PCEF_{µMS} von 1, 0,1 bzw. 0,003 entsprechen würde und somit auch bei der 3-fach höheren UVA-Dosis sehr gut mit den hier gefundenen Werten von 1, 0,16 und 0,003 übereinstimmt (Kersten et al. 2002, Kersten et al. 1999). Im *in vivo* Photo-Irritationstest (topische Applikation) zeigte sich bei 5-MOP am Menschen eine konzentrationsabhängige Erythem-, Ödem- und Vesikel-Bildung, und zwar stärker als bei Pimpinellin, Sphondin, Isopimpinellin oder Isobergapten. Die höchste Reaktivität wurde bei einer Bestrahlung mit Licht von 335 nm Wellenlänge beobachtet (Kavli et al. 1983b).

Auerbeck bzw. Papadopoulos zeigten in V79-Zellen generell ein etwa 2,5-fach höheres Potential von 5-MOP im Vergleich zu 8-MOP, phototoxische Effekte, Mutationen (TG-Resistenz) oder generell Monoaddukt-Bildungen hervorzurufen. Dennoch sind, einzeln betrachtet, 8-MOP-Addukte toxischer, da diese sich leichter in Crosslinks überführen lassen. Weiterhin ist die Dissoziations-Konstante K_D ($K_D = \text{Konz}_{\text{FC, frei}} \times \text{Konz}_{\text{Bindungsstelle, frei}} / \text{Konz}_{\text{FC, gebunden}}$ in mol/l) der FC-DNA-Komplex-Bildung bei 5-MOP (3,5 * 10⁻⁴) zwar deutlich kleiner als die von 8-MOP (1,4 * 10⁻³), dennoch bindet 5-MOP nur minimal

stärker an die DNA als 8-MOP (Averbeck and Papadopoulo 1986, Papadopoulo and Averbeck 1985). Andere Autoren zeigten im Gegensatz zu den Ergebnissen von Averbeck und Papadopoulo für 8-MOP ein deutlich größeres Potential, an die DNA zu binden (Isaacs, Wieseahn and Hallick 1984).

Rodighiero et al. (1970) fanden bei 8-MOP-Inkubationen sogar doppelt so viele DNA-Addukte wie bei 5-MOP-Inkubationen. Das waren nicht die einzigen gegensätzlichen Ergebnisse in der Literatur: Ashwood-Smith et al. (1980) fanden in verschiedenen Testsystemen wie Phototoxizität und Ames-Test in *E. coli* WP2 try⁻ oder Phototoxizität in CHO-Zellen die Reihenfolge Psoralen > 8-MOP > 5-MOP > Angelicin. Averbeck et al. (1981) zeigten in *S. cerevisiae* ebenfalls eine stärkere Phototoxizität und -mutagenität von 8-MOP gegenüber 5-MOP. Derartige Abweichungen sind z.B. über eine möglicherweise andere Bestrahlungswellenlänge zu erklären, da das exakte Emissionsspektrum der Strahlungsquelle nicht bekannt ist und die Anregungswellenlänge für die größtmögliche Systemantwort bei 5-MOP und 8-MOP, auch systemabhängig, unterschiedlich ist: Auch wenn alle FCs unterhalb von 320 nm absorbieren, ist entgegen dem Grotthus-Draper-Gesetz, womöglich aufgrund der Rotverschiebung des Absorptionsspektrums nach DNA-Interkalation, die optimale Wellenlänge zur DNA-Addukt-Bildung für 5-MOP 334 nm, für 8-MOP 320 nm, für Photosensibilisierung *in vivo* für 8-MOP sogar bei 340-360 nm (Musajo and Rodighiero 1972, Scott, Pathak and Mohn 1976). Becker et al. (1993) zeigten in Methanol ein Absorptionsmaximum für den $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang von ca. 350 nm für 5-MOP (Psoralen: 330 nm, 8-MOP: 340 nm), was deutlich näher am Emissionsmaximum ($\lambda_{\text{max}} = 365$ nm) der verwendeten Strahlungsquelle liegt und somit einen Übergang in den reaktiven Zustand deutlich wahrscheinlicher macht.

Prinzipiell scheint in erster Linie die Ausbildung kovalenter DNA-Addukte für die beobachteten Effekte verantwortlich zu sein, da die Photoproduktion von $^1\text{O}_2$ und $\text{O}_2^{\cdot-}$ zwar vorhanden, aber nicht besonders ausgeprägt ist, wie schon von Pathak und Joshi gezeigt wurde (Pathak and Joshi 1984).

8-MOP:

8-MOP ist, womöglich aufgrund seines häufigen Einsatzes in der PUVA-Therapie, eines der am besten untersuchten Furocumarine (Lai et al. 2008).

In V79-Zellen zeigten Papadopoulo et al. eine UVA-dosis- und konzentrationsabhängige Phototoxizität von 8-MOP: Die EC₅₀-Werte liegen bei ca. 5 μM (225 mJ/cm²) und 50 μM (50 mJ/cm²), bestimmt über die Plating Efficiency nach 7 d, die in dieser Arbeit gefundenen Werte liegen mit 78 μM (125 mJ/cm²) darüber, können aber auch aufgrund der unterschiedlichen Vitalitätsbestimmung und Nachinkubationszeit als etwa äquivalent angesehen werden (Papadopoulo and Averbeck 1985, Papadopoulo, Sagliocco and Averbeck 1983).

Uwaifo et al. (1983) fanden durch Bestimmung der Plating efficiency ein ähnliches, minimal stärkeres phototoxisches Potential von 8-MOP im Vergleich zu Imperatorin in V79-Zellen in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit bestimmten PMEFs von 0,20 resp. 0,15. In L5178Y Maus-Lymphom-Zellen konnten 10 min nach der Vorinkubation mit 75-150 $\mu\text{g/ml}$ und der Bestrahlung mit 600/30 mJ/cm² UVA/UVB im Alamar Blue- und Trypanblau-Test keine phototoxischen Effekte gezeigt werden, was mit dem in dieser Arbeit gefundenen späten Auftreten toxischer Effekte übereinstimmt; spätere Zeitpunkte wurden von den Autoren allerdings nicht untersucht (Struwe et al. 2007). Dass die Viabilität sehr stark von der verwendeten Zelllinie abhängig ist, konnten Papadopoulo und

Moustacchi an verschiedenen humanen Lymphoblasten zeigen: Bei ihnen variierten die EC_{50} -Werte der UVA-Dosis bei einer fixen 8-MOP-Konzentration von 5 μM zwischen 50 und 110 mJ/cm^2 , was zudem noch unter den in dieser Arbeit gefundenen Werten bei V79-Zellen liegt (Papadopoulo and Moustacchi 1990, Papadopoulo, Porfirio and Moustacchi 1990). Analoge Variabilitäten traten auch bei der Entstehung 6-TG-resistenter Mutanten auf oder zwischen V79- und CHO-Zellen (Erexson, Periago and Spicer 2001). Auch Uwaifo et al. (1983) bestimmten den EC_{50} -Wert in V79-Zellen auf ca. 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei 127,5 mJ/cm^2 und fanden bei 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine Erhöhung der Mutationsfrequenz (8-Azaguanin-Resistenz) auf das 20-fache der Kontrolle, was sich abhängig von der Spontan-MF nicht sehr von den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen unterscheidet (12-fache Erhöhung). Eine ähnliche Phototoxizität und -mutagenität wurde auch von Chiou in HFW-Humanfibroblasten beschrieben (Chiou and Yang 1995). Babudri et al. (1981) stellten analog zu den hier für 5-MOP gefundenen Ergebnissen einen linearen Anstieg der HPRT-defizienten V79-Mutanten mit der UVA-Dosis fest, was prinzipiell auch hier für 8-MOP zu erwarten war. Von Loveday und Donahue (1984) konnte ein Anstieg der Zahl der HPRT-defizienten CHO-Zellen und SCE bei einer Inkubation mit ca. $1 \cdot 10^{-6}$ M 5-MOP und 8-MOP gezeigt werden.

Kersten et al. (1999) fanden in V79-Zellen ein Maximum der mikrokerntragenden Zellen von je ca. 36% bei einer Inkubation mit 10 μM bzw. 1 μM 8-MOP nach einer Bestrahlung mit 100/2,5 bzw. 400/10 mJ/cm^2 UVA/UVB, in dieser Arbeit konnte ein Maximum von ca. 16% bei 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (= 46 μM) detektiert werden. Somit ist die maximale MNZ-Zahl in dieser Arbeit halb so hoch, die entsprechende Konzentration, korrigiert um die UVA-Dosis, etwa 3-4-fach höher, wofür zwei Ursachen in Frage kommen: Der von den Autoren eingesetzte Konzentrationsbereich war deutlich weiter gewählt, weshalb der exakte Wert womöglich nicht detektiert wurde. Weiterhin betrug die Nachinkubationszeit 24 h statt 20 h, wodurch die in diesen Konzentrationen auftretenden zytostatischen Effekte (Bethea et al. 1999) womöglich kompensiert wurden und durch Zellproliferation auftretende weitere Mikrokernne detektiert werden konnten, die in dieser Arbeit nicht erfasst wurden. Das Auftreten von Mikrokernen wurde z.B. auch in humanen Fibroblasten gezeigt (Stivala et al. 1995).

Weiterhin konnten Struwe et al. (2007) eine durch Crosslinks induzierte Photogentoxizität in L5178Y-Zellen im Comet-Assay zeigen, da die tail intensity 4-9-fach im Vergleich zur Negativkontrolle reduziert war. Mori et al. (2001) beobachteten eine Erhöhung der UDS *in vivo* in der Epidermis haarloser Mäuse.

8-MOP ist literaturkonform ebenfalls nur in geringem Maße in der Lage, $^1\text{O}_2$ und $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu bilden (Pathak and Joshi 1984).

Angelicin:

Angelicin zeigt als monofunktionales Furocumarin generell deutlich geringere phototoxische und -mutagene Effekte als die linearen oder künstlich synthetisierten, methylierten Vertreter (vgl. 7.1.2.2)(Bordin, Dall'Acqua and Guiotto 1991, Venturini et al. 1981).

In haploider und diploider *S. cerevisiae* unter verschiedenen Versuchsbedingungen zeigt Angelicin im Kombination mit UVA-Licht im Mittel eine etwa 20-fach schwächere Phototoxizität als Psoralen, was mit den hier gefundenen Effekten in V79-Zellen übereinstimmt (Averbeck, Chandra and Biswas 1975).

Kersten et al. (2002) konnten eine UVA-dosisabhängige Zunahme des Maximums der MNZ-Zahl auf ca. 17% bzw. 26% in V79-Zellen zeigen; nach einer Dosis von 100/2,3 bzw. 400/9,5 mJ/cm² UVA/UVB war das Maximum bei 100-300 µM bzw. 30 µM erreicht. Ein Maximum konnte in der von mir etablierten Versuchsanordnung nicht erreicht werden, bei einer UVA-Dosis von 125 mJ/cm² war bei 430 µM, einem Anteil mikrokerntragender Zellen von 6% und nur 20 h statt 24 h Nachinkubationszeit immer noch ein linearer Anstieg zu verzeichnen. Dennoch kann in dem relevanten Bereich eine sehr gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten angenommen werden. Eine erhöhte Zahl der MNZ ohne Bestrahlung konnte von den Autoren ebenfalls nicht gezeigt werden, auch im Vergleich mit 5-MOP und 8-MOP (s.o.) zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit gefundenen clastogenen Potential (Kersten et al. 2002, Kersten et al. 1999).

Angelicin ist in der Lage, sowohl in CHO-Zellen als auch normalen humanen Fibroblasten SCEs zu induzieren, hingegen deutlich weniger als 5-MOP oder 8-MOP. Allerdings induzierte Angelicin in den reparaturdefizienten (und somit sensitiveren) Ataxia telangiectasia und Xeroderma Pigmentosum Zellen eine vergleichbare Menge SCEs. Zurückzuführen ist die beobachtete Genotoxizität somit allein auf Monoaddukte, da die letalen Crosslinks von 5-MOP und 8-MOP und daher auch die geringere Bindungsaffinität von Angelicin zur DNA nicht mehr detektiert werden können (Bordin et al. 1991). Neben der Tatsache, dass Angelicin nur Monoaddukte ausbildet, zeigt Angelicin nämlich auch eine geringere Bindungsaffinität zur DNA als einige lineare FCs. Setzt man die Zahl der an die DNA gebundenen FC-Moleküle nach UVA-Bestrahlung von Psoralen auf 100%, finden sich bei Angelicin nur etwa 15% (Bordin et al. 1991, Rodighiero et al. 1970). Ähnliche Effekte konnten auch durch den Vergleich von Angelicin mit Psoralen (je 34,4 µg/ml) an je einem Reparatur-kompetenten und einem Exzisionsreparatur-defizienten Stamm von *S. cerevisiae* gezeigt werden. Während im kompetenten Stamm die Vitalität nach Bestrahlung mit 200 mJ/cm² bei Angelicin nicht beeinflusst wurde und bei Psoralen bei 1% lag, zeigte sich im defizienten Stamm eine Vitalität von 1% bei Psoralen bei ca. 40 mJ/cm², bei Angelicin bei ca. 110 mJ/cm² (Grant, von Borstel and Ashwood-Smith 1979). Dies lässt auf ein geringeres, dennoch ähnliches Potential zur Adduktbildung schließen, da im Reparatur-defizienten Stamm auch Monoaddukte letal wirken und nicht nur wie im kompetenten Stamm hauptsächlich Crosslinks (vgl. 7.1.2.1).

Pathak und Joshi zeigten, dass Angelicin starker Bildner von photochemisch generiertem ¹O₂ und ein moderater Bildner von O₂^{•-} ist, was mit den hier gefundenen Ergebnissen übereinstimmt (Pathak and Joshi 1984, Joshi and Pathak 1983). Betrachtet man die photohämolytischen Eigenschaften von Angelicin, die die Autoren auf die Generierung von ¹O₂ zurückführten, entspricht die dort gezeigte Reihenfolge Psoralen >> Angelicin >> 8-MOP den hier gefundenen Ergebnissen (Bordin et al. 1991).

Bergaptol:

Bergaptol oder 5-Hydroxypsoralen war in allen zellbasierten Assays nach UVA-Bestrahlung völlig inaktiv, was in verschiedenen biologischen Systemen bereits gezeigt werden konnte (Musajo and Rodighiero 1972): In *Bacillus subtilis* war Bergaptol im Vergleich zu 5-MOP weder phototoxisch noch mutagen (Song et al. 1975). Keine phototoxischen Effekte wie Erytheme oder Bläschen konnten im Gegensatz zu 5-MOP oder 8-MOP in vivo auf der Haut von 1-3 d alten Hühnerküken gezeigt werden (Ivie 1978).

Song et al. (1975) führen dieses Verhalten auf die mangelnde Ausbildung des reaktiven Zustands zurück (vgl. 7.2.1.2).

Bezüglich der Bildung von ROS zeigte sich Bergaptol literaturkonform nicht nur völlig inaktiv bei der Bildung von $^1\text{O}_2$ (Cannistraro and Van de Vorst 1977), sondern vermindert auch die DMSO-vermittelte Bildung von $\text{O}_2^{\cdot-}$ und wirkt somit als Radikalfänger (Girennavar et al. 2007), was auf das leicht abzuspaltende Proton aus der aromatischen Hydroxygruppe zurückzuführen ist (Siddhuraju, Mohan and Becker 2002).

Byakangelicin:

Byakangelicin trat in der Literatur meist nur als Inhaltsstoff verschiedener Angelica-Arten wie Engelwurz (*Angelica archangelica*), sibirischer Engelwurz (*Angelica dahurica*) oder Bärenklau-Arten in Erscheinung (Fujioka et al. 1999, HMPC 2007, Matsuda et al. 2005, Oh et al. 2002). Weiterhin wurden inhibitorische Effekte, z.B. auf die LPS-induzierte Prostaglandin E₂-Synthese von Makrophagen aus Ratten-Peritonealzellen (Ban et al. 2003), Aldose-Reduktase in Ratten (Shin, Chung and Cho 1994) oder eine schwache Hemmung der Melanogenese in B16 Maus-Melanom-Zellen (Matsuda et al. 2005) gezeigt, Beschreibungen von phototoxischen oder photogentoxischen Effekten fehlen gänzlich. Diese konnten in dieser Arbeit auch nicht gezeigt werden; offenbar resultiert die Einführung der 2,3-Dihydroxy-3-methylbutoxy-Gruppe in Position 8 im Verlust der photochemischen Reaktivität im Vergleich zu 5-MOP oder Oxypeucedaninhydrat (vgl. 7.2.1.2), wofür auch das Ausbleiben der $^1\text{O}_2$ -Produktion spricht.

6',7'-Dihydroxybergamottin:

DHB ist neben Bergamottin die Haupt-FC-Komponente in frischem Grapefruitsaft (Myung, Narciso and Manthey 2008, Raquet 2007), nach dem Pasteurisieren findet sich zunehmend auch Bergaptol als Abbauprodukt (Uesawa and Mohri 2006a). Hauptsächlich wird in der Literatur der Einfluss von DHB auf den Fremdstoffmetabolismus beschrieben, wie die Inaktivierung von CYP3A4 in humanen Lebermikrosomen, intestinale S9 und *E.coli*-Membranen (Bellevue et al. 1997, Row et al. 2006). DHB zeigt aber auch eine Hemmung der TCDD-induzierten EROD-Aktivität (CYP1A1) in H4IIE-Rattenhepatomzellen (Raquet 2007) oder des P-Glycoprotein-vermittelten Transports von Talinolol in Caco-2 Zellen (de Castro et al. 2007). Daten zu phototoxischen oder photogentoxischen Eigenschaften in Analogie zu den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen sind hingegen noch nicht beschrieben. Auffällig bei den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen sind die ähnlichen phototoxischen Eigenschaften von DHB (Hydroxygruppen in 6',7'-Position der Seitenkette) und Epoxybergamottin (Epoxygruppe in 6',7'-Position), die sich allerdings vom quasi inaktiven Bergamottin (Doppelbindung in 6',7'-Position) trotz ähnlicher sterisch anspruchsvoller Seitenkette unterscheiden. Möglicherweise liefert die verminderte Wasserlöslichkeit des Bergamottins, somit eventuell ein Ausfallen des Bergamottins als Feststoff und die daraus resultierende geringere Bioverfügbarkeit, eine Erklärung, da die sterisch anspruchsvolle Seitenkette alleine nicht gegen eine Aufnahme und Interkalation spricht. Ähnliche PMEFs, aber halb so große PTEFs und PCEFs lassen auf eine im Vergleich zu Epoxybergamottin zwar verminderte, aber dennoch ausgeprägte Fähigkeit des DHBs zur Ausbildung von Crosslinks schließen, da das photoclastogene Potential stärker als das -mutagene ausgeprägt ist (vgl. 7.2.1.1).

Epoxybergamottin:

Auch bei Epoxybergamottin finden sich als Komponente im Grapefruitsaft (Guo and Yamazoe 2004) hauptsächlich Beschreibungen der inhibitorischen Wirkung auf CYP3A4, z.B. in CYP3A4-transfizierten humanen Leberepithelzellen (Wangenstein et al. 2003) oder humanen Lebermikrosomen und intestinalem S9. Hierfür sind die 4',5'-DB und die Einführung von Sauerstoff an die Geranoylgruppe in Pos. 5 essentiell (Row et al. 2006). Weiterhin ist die Hemmung des P-Glycoprotein-vermittelten Transports von Talinolol in Caco-2 Zellen mit einer 50-fach höheren Potenz als DHB (de Castro et al. 2007) beschrieben. Auch für Epoxybergamottin finden sich in der Literatur keine vergleichbaren Daten zur photochemischen Aktivität.

Im HPRT-Assay finden sich fast identische Werte in Kombination mit UVA-Licht wie bei dem strukturverwandten DHB, jedoch ein fast doppelt so großes phototoxisches und -clastogenes Potential, weshalb die zwar weit von den reaktiven Zentren am FC-Grundgerüst entfernte Epoxygruppe einen Einfluss auf die Fähigkeit zur Ausbildung von Crosslinks im Vergleich zu DHB zu haben scheint (vgl. 7.2.1.1). Epoxybergamottin verursacht ohne Lichteinfluss unter den gewählten Bedingungen keine adversen Effekte im HPRT-Assay oder dem Mikrokerntest, wohingegen im Resazurin-Reduktionstest eine konzentrationsabhängige Abnahme der Vitalität beobachtet wird. Dies könnte durch dessen Epoxygruppe verursacht werden, die als mittelweiches Elektrophil z.B. Thiolgruppen der Aminosäuren oder die Ring-Stickstoffatome der Basen der DNA/RNA alkylieren kann, was zu Struktur- und Funktionsstörungen von Proteinen oder Nukleinsäuren führen kann (Hermens 1990). Ähnliche toxische Effekte unter Lichtausschluss konnten für die anderen Furocumarine mit Epoxygruppen, Heraclenin und Oxypeucedanin, allerdings nicht beobachtet werden (vgl. 7.2.1.2). So bleibt nur zu vermuten, dass Epoxybergamottin als einziges FC mit seiner Epoxygruppe möglicherweise andere Zellkomponenten als die DNA schädigt

Heraclenin:

Als Epoxid ist Heraclenin auch ohne Aktivierung durch UVA-Licht potentiell mutagen, was von verschiedenen Autoren an humanen Lymphozyten mit einer 5-fachen Erhöhung der Chromosomenaberrationen nach 24 h Inkubation mit 10 µg/ml (Abel and Schimmer 1986) oder durch eine schwache Mutagenität im Ames-Test an *Salmonella typhimurium* (Ivie, Macgregor and Hammock 1980) gezeigt wurde. In Jurkat-Zellen wurde eine dosisabhängige (10 bzw. 25 µg/ml, 48 bzw. 72h) Induktion des Zellzyklusarrests und Apoptose gefunden (Appendino et al. 2004). Analoge Ergebnisse konnten in keinem der in dieser Arbeit verwendeten Testsysteme erzielt werden, was möglicherweise auf die deutlich kürzere Inkubationszeit zurückzuführen ist. In Kombination mit UVA-Licht (bis 1440 mJ/cm²) zeigte Heraclenin (5µg/ml) in arg⁻ und str^d Mutanten von *Chlamydomonas reinhardtii* eine UVA-dosisabhängige Reduktion der Vitalität und Zunahme der Revertanten (Schimmer and Abel 1986, Schimmer and Kühne 1990), wobei die Reversion etwa halb so stark wie bei Imperatorin und etwa ein 20stel so stark wie bei 5-MOP ausgeprägt war und ohne UVA-Licht gar nicht festzustellen war, was den Beobachtungen im HPRT-Assay an V79-Zellen entspricht. Die PTEF, PMEF und PCEF liegen in der gleichen Größenordnung, was für ein ähnliches Addukt-Bildungs-Verhalten wie 5-MOP spricht.

Imperatorin:

Auch ohne UVA-Aktivierung sind verschiedene Effekte von Imperatorin beschrieben, wie die Inhibierung der induzierten Prostaglandin E_2 -Synthese und NO-Bildung in murinen Peritoneal-Makrophagen (Abad et al. 2001). Imperatorin zeigte auch antiproliferative Effekte in verschiedenen humanen Karzinomzelllinien nach 48 h Inkubation (Kim, Kim and Ryu 2007), in Jurkat- und HL-60 Zellen wurde eine dosis- und zeitabhängige Induktion von Apoptosen gefunden (Appendino et al. 2004, Pae et al. 2002), die auch beide in dieser Arbeit aufgrund der kurzen Inkubationszeit nicht feststellbar waren.

Uwaifo et al. (1983) fanden in V79-Zellen ähnliche zytotoxische und mutagene Effekte wie für 8-MOP: Bei einer UVA-Dosis von ca. $127,5 \text{ mJ/cm}^2$ betrugen die EC_{50} -Werte für beide etwa 3 µg/ml . Die in dieser Arbeit gefundenen sind mit $21,7 \text{ µg/ml}$ für Imperatorin allerdings etwa 6-7-fach größer. Auch die von diesen Autoren beschriebene Erhöhung der Mutationsfrequenz (8-Azaguanin-Resistenz) bei 10 µg/ml auf das 20-fache der Kontrolle liegt in dieser Arbeit nur bei dem etwa 6-fachen und steigt bei 20 µg/ml auf etwa das 12-fache an. Diese Konzentrationen verursachen allerdings schon eine Verringerung der Vitalität auf etwa 50%. Derartige Varianzen bei den Ergebnissen sind allerdings noch durch laborspezifische Unterschiede in den V79-Zellen (Glatt 1993) oder der Lichtquelle erklärbar. In humanen Lymphozyten zeigte Imperatorin hingegen unter UVA-Bestrahlung keine Induktion von SCEs im Vergleich zu 8-MOP, in *C. reinhardtii* eine schwächere Phototoxizität und unter verschiedenen Testkonditionen eine meist schwächere Photomutagenität als 8-MOP (Abel and Schimmer 1981). Auch z.B. eine ca. 20-fach schwächere Entstehung von Arg^+ -Revertanten im Vergleich zu 5-MOP konnte gezeigt werden (Schimmer and Kühne 1990), wobei letzteres mit den hier gefundenen Ergebnissen in V79-Zellen etwa übereinstimmt. Bei einer UVA-Bestrahlung mit $\lambda_{\text{max}} \approx 350 \text{ nm}$ zeigte Imperatorin im Vergleich zu Psoralen oder Angelicin jedoch keine phototoxischen oder -mutagenen Effekte in verschiedenen *E.coli* Stämmen (Tuveson, Berenbaum and Heining 1986).

Isobergapten:

Von dem in vielen Heracleum-Arten verbreiteten angularen FC sind in der Literatur keine phototoxischen Effekte beschrieben: Im Vergleich zu 5-MOP oder Pimpinellin konnten an Probanden nach topischer Applikation und anschließender UVA-Bestrahlung keine Erytheme oder Bläschen beobachtet werden, ebenso wenig wie phototoxische Effekte in *Candida albicans* (Kavli et al. 1983b). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten keine phototoxischen oder -clastogenen Effekte festgestellt werden, allerdings waren im HPRT-Assay photomutagene Effekte zu verzeichnen, die nur bei Isobergapten einem nicht-linearen dosisabhängigen Verlauf folgten, der sich kurvenförmig bei 80 µg/ml einer Mutationsfrequenz von ca. $65 \cdot 10^{-6}$ annäherte. Dies ist vermutlich auf eine verminderte Bioverfügbarkeit von Isobergapten zurückzuführen, womöglich aufgrund einer Präzipitation des zuvor gelösten FCs ab etwa 15 mg/ml auf der Zellmembran. Dadurch wurde die Isobergapten-Konzentration in der Zelle mit steigender Dosis nahezu konstant gehalten und somit konnte auch keine Zunahme der MF mehr beobachtet werden. Aufgrund der angularen Struktur (vgl. 7.2.1.1) ist keine ICL-Bildung möglich, weshalb die schwächer ausgeprägten photomutagenen Effekte mit den nicht detektierbaren phototoxischen und -clastogenen Effekten vereinbar sind.

Isoimperatorin:

Zu dem in *Angelica*-Arten vorkommenden FC sind verschiedene Effekte unter Lichtausschluss berichtet, wie etwa die Verringerung der Aflatoxin B₁-induzierten Zytotoxizität in H4IIE-Zellen durch posttranskriptionale CYP1A1-Hemmung (Pokharel et al. 2006) oder die antiproliferative Wirkung in verschiedenen humanen Tumorzelllinien, die hier aufgrund der kürzeren Inkubationszeit (0,5 h vs. 48 h) nicht beobachtet werden konnten (Kim et al. 2007). In Kombination mit UVA-Licht zeigte Isoimperatorin stärkere phototoxische Effekte im Hühner-Bioassay (orale Gabe) als das analoge Epoxid Oxypeucedanin (Yost, Stermitz and Williams 1977), die Phototoxizität in Lymphozyten war deutlich geringer als bei 8-MOP (Gast et al. 1991). Auch die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse sind nicht eindeutig erklärbar: Das photoclastogene Potential zeigt sich durch einen starken Anstieg der MNZ auf etwa $110 \cdot 10^{-3}$ bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml. Dann wird ein Plateau erreicht, was entweder durch zytostatische Effekte (Bethea et al. 1999) oder Präzipitation der Inkubationssubstanz zu erklären ist. Gleichzeitig findet in geringerem Maße ein Anstieg der Mutationsfrequenz statt, was auf eine Präferenz der Crosslinkbildung schließen lässt. Die kaum vorhandene Phototoxizität schließt andererseits eine Crosslinkbildung aus. Auch eine Photoproduktion von ROS war nicht zu beobachten.

Khellin:

Das Furanochromon Khellin verfügt über ähnliche strukturelle und photochemische Eigenschaften wie FCs, weshalb es bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Äquivalenzfaktoren-(PXEF)-Konzept mit berücksichtigt werden kann. Khellin weist eine schwächere DNA-Affinität als 8-MOP auf ($3 \cdot 10^{-2}$ vs. $5 \cdot 10^{-2}$ mögliche Bindungsstellen pro Nukleotid) (Morliere et al. 1988). In *Arg. C. reinhardii* traten bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml bei einer Bestrahlung mit 7,3 J/cm² keine signifikanten mutagenen Effekte auf (Schimmer 1997). Auch in *S. typhimurium* konnten bei 36 µg/ml und 500 mJ/cm² UVA-Bestrahlung nur geringfügige phototoxische und -mutagene Effekte gezeigt werden (Riccio et al. 1992). In diploider Hefe konnten keine phototoxischen Effekte bei 88 mg/ml bis zu einer Dosis von 40 J/cm² festgestellt werden. Erste photomutagene Effekte (Aberrationen) im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle traten erst ab einer Dosis von 7 J/cm² auf (Morliere et al. 1988). Ebenso konnte eine Abstufung antiviraler Effekte in Bacteriophage T4 nach UVA-Bestrahlung gemäß 8-MOP > Angelicin > Khellin gezeigt werden (Hudson 1989).

Dies ist in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen unter den gewählten Bestrahlungs-Bedingungen, da keine phototoxischen oder -mutagenen Effekte gefunden wurden; lediglich im MN-Assay wurden ab 75 µg/ml signifikante Erhöhungen der mikrokerntragenden Zellen $\cdot 10^{-3}$ gegenüber der unbestrahlten Probe, nicht jedoch aufgrund höherer Standardabweichungen gegenüber der Lösemittelkontrolle, gezeigt.

Limettin:

Das u.a. in Limetten vorkommende (Nigg et al. 1993) dimethoxysubstituierte Cumarin zeigt aufgrund seiner Interkalationsfähigkeit im Vergleich zu anderen Cumarin-Derivaten ähnliche photochemische Eigenschaften wie Furocumarine, weshalb es wie Khellin ebenfalls im hier vorgestellten PXEF-Konzept berücksichtigt werden kann.

Es interkaliert zwischen die Basen der DNA maximal etwa alle 160 Nukleotide mit einer etwa 2-fach höheren Präferenz für A/T-reiche Regionen anstatt G/C-reiche, 8-MOP

hingegen interkaliert etwa alle 50 Nukleotide (Ou et al. 1978). Analog zu 5-MOP findet die Anregung in den Triplett-Zustand durch UVA-Licht im Pyrrole-Teil des Moleküls statt. Limettin und 5-MOP haben die gleiche Phosphoreszenz-Lebensdauer und Charge-Transfer-Resonanzstruktur, unterschieden sich jedoch durch die Bevölkerung des Triplett-Zustands, was die geringere Reaktivität des Limettins erklärt. Trotzdem kann eine mögliche DNA-Addukt-Bildung aus dem deutlich häufiger besetzten Singulett-Zustand heraus auch nicht ausgeschlossen werden. Die ähnlichen, wenn auch weniger besetzten angeregten Zustände erklären auch die schwächere, aber dennoch deutlich vorhandene Bildung von Singulett-Sauerstoff. Der Zusammenhang der Bildung von $^1\text{O}_2$ und $\text{O}_2^{\cdot-}$ ist allerdings noch nicht geklärt (Bordin et al. 1991). Zudem kann Limettin aufgrund der mangelnden Furan-DB keine DNA-ICLs bilden (Mantulin and Song 1973, Ou et al. 1976). Im Dunkeln verursachte Limettin z.B. Frameshift-Mutationen in *E. coli* (Ashwood-Smith, Poulton and Liu 1983) und nach 96 h Inkubation eine Wachstumsinhibition an B16F1- und A375-Melanomzelllinien (Maus und Mensch), was in dieser Arbeit analog aufgrund der kürzeren Inkubationszeit nicht beobachtet werden konnte. Unter UVA-Bestrahlung konnten neben SCEs in CHO-Zellen auch phototoxische Effekte beobachtet werden; als EC_{50} -Wert wurde eine Kombination aus 40 $\mu\text{g/ml}$ Limettin und 300-400 mJ/cm^2 UVA ermittelt (Ashwood-Smith et al. 1983). In der gleichen Größenordnung befinden sich die in dieser Arbeit gefundenen Werte für V79-Zellen (74 $\mu\text{g/ml}$ und 125 mJ/cm^2). Im Vergleich zu 8-MOP und Psoralen ist Limettin weniger, im Vergleich zum inaktiven Isopimpinellin jedoch stärker phototoxisch in verschiedenen *E.coli*-Stämmen (Marchant et al. 1985). An Probanden konnten allerdings nach topischer Applikation mit anschließender UVA-Bestrahlung im Vergleich zu 5-MOP keine phototoxischen Effekte gezeigt werden (Marzulli and Maibach 1970), was die Extrapolation der *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* erschwert (vgl. 7.6). Wie erwartet sind beim monofunktionalen Limettin die photomutagenen Effekte deutlicher als die -clastogenen (vgl. 7.2.1).

Oxypeucedanin:

Antiproliferative Effekte wie in verschiedenen humanen Tumorzelllinien nach 48 h Inkubation ohne UVA-Bestrahlung (Kim et al. 2007) oder eine schwache Mutagenität wie in *S. typhimurium*, womöglich aufgrund der Epoxygruppe, (Ivie et al. 1980) konnten in dieser Arbeit vermutlich aufgrund der kurzen Inkubationszeit (0,5 h) nicht gezeigt werden. Im Hühner-Bio-Assay (subcutane Injektion) war Oxypeucedanin etwa dreimal weniger phototoxisch als 5-MOP. Bei 33 μg Oxypeucedanin, appliziert in 10 μl DMSO, zeigten sich nach 24 h UVA-Bestrahlung (6 d Nachbeobachtung) Bläschen, bei gleicher Applikation von 100 μg Oxypeucedanin schwere phototoxische Reaktionen wie dunkle trockene Haut (Ivie 1978), jedoch blieb eine Reaktion im Dunkeln aus. An haarlosen Albino-Meerschweinchen (topische Applikation) konnte eine vierfach schwächere Phototoxizität als bei 5-MOP festgestellt werden (Naganuma et al. 1985). Diese Abstufung liegt in der gleichen Größenordnung wie die in dieser Arbeit gezeigten PXEF-Werte. Auch an Probanden (topische Applikation) konnte eine schwächere Phototoxizität im Vergleich zu 5-MOP oder 8-MOP gezeigt werden (Musajo and Rodighiero 1962).

Analog zu DHB oder Epoxybergamottin zeigen sich in dieser Arbeit ein hohes phototoxisches, ein moderates photoclastogenes und ein geringes photomutagenes Potential, was auf eine sehr stark ausgeprägte Crosslinkbildung und sperrige Addukte schließen lässt (vgl. 7.2.1). Im Vergleich zu Oxypeucedaninhydrat zeigt das Epoxid analog zu DHB und Epoxybergamottin eine zweifach höhere Phototoxizität

($EC_{50, \mu M} = 33,4$ vs. $69,4 \mu M$), aber stark ähnliche PMEF- und PCEF-Werte. Offenbar ist ein größeres Potential von Oxypeucedanin zur Crosslinkbildung als Ursache nicht wahrscheinlich, auch ist die Fähigkeit zur Bildung von 1O_2 nur wenig größer.

Oxypeucedaninhydrat:

Wie schon von Kim et al. (2007) an verschiedenen humanen Tumorzelllinien gezeigt, konnten auch in dieser Arbeit keine antiproliferativen Effekte festgestellt werden. Nach UVA-Bestrahlung zeigte Oxypeucedaninhydrat (OxH) *in vitro* in Lymphozyten nur geringe phototoxische Effekte (Gast et al. 1991). *In vivo* im Hühner-Bioassay (subcutane Injektion) war OxH im Vergleich zu Oxypeucedanin dreimal phototoxischer und somit äquivalent zu 5-MOP (Ivie 1978). Die in dieser Arbeit *in vitro* in V79-Zellen gezeigten phototoxischen Effekte von OxH waren jedoch etwa 6-fach schwächer als die von 5-MOP ausgeprägt.

Phellopterin:

Phellopterin verursacht eine stärkere Inhibierung der Lipid-Peroxidation durch murine Mikrosomen im Vergleich zu Isoimperatorin oder Byakangelicin (Shin et al. 1993); phototoxische Eigenschaften sind allerdings nicht beschrieben. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten keine photo(gen)toxischen Eigenschaften aufgezeigt werden.

Pimpinellin:

An Probanden (topische Applikation) zeigte Pimpinellin nahezu gleiche phototoxische Eigenschaften (Erythembildung, Blasen) wie 5-MOP und deutlich stärkere als Sphondin, in *C. albicans* verursachte es unter UVA-Bestrahlung eine etwa zweifach schwächere Wachstumsinhibition wie 5-MOP (Kavli et al. 1983b). Analoge Eigenschaften konnten in dieser Arbeit nicht aufgezeigt werden: Hier war es photochemisch völlig inaktiv. Als möglicher Grund können Unterschiede in der Strahlungsquelle ausgeschlossen werden, da 5-MOP und Pimpinellin bei der gleichen Wellenlänge (330-335 nm) das größte phototoxische Potential zeigen (Kavli et al. 1983a).

Sphondin:

An Probanden (topische Applikation) zeigte Sphondin nur sehr schwache, ca. 100-fach geringere phototoxische Effekte im Vergleich zu 5-MOP. Eine ähnliche Abstufung wurde auch in *C. albicans* gezeigt (Kavli et al. 1983b), was für den in dieser Arbeit gezeigten PTEF von 0,07 nicht ganz zutrifft. Die gleichen Autoren zeigten allerdings an einem anderen Probanden, dass bei ihm die minimale UVA-Dosis zur Auslösung eines Erythems nur etwa 10-fach höher ist (Kavli et al. 1983a), was somit eher mit einem PTEF von 0,07 vergleichbar ist.

Sphondin weist gegenüber Angelicin höhere PXEFs auf und produziert mehr $O_2^{\cdot-}$, allerdings weniger 1O_2 . In Methanol konnte für Sphondin ein Absorptionsmaximum für den $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang von 341 nm gemessen werden, das von Angelicin liegt bei ca. 325 nm (Becker et al. 1993). Der Wert für Sphondin liegt somit näher an dem Emissionsmaximum der in dieser Arbeit verwendeten Strahlungsquelle ($\lambda_{max} = 365$ nm), weshalb die Anregung in den reaktiven Zustand wahrscheinlicher wird, was die Unterschiede in der Reaktivität erklären könnte. Die Angabe von λ_{max} für den $n \rightarrow \pi^*$ Übergang ist unspezifisch und liegt generell für Furocumarine bei ca. 360 nm. Auch ist die

Lebensdauer des Triplett-Zustands von Sphondin mit 10,3 μ s im Vergleich zu 0,8 μ s von Angelicin deutlich länger, was unter der Annahme, dass die Cycloaddition an die DNA nicht aus dem Singulett-, sondern aus dem Triplett-Zustand heraus stattfindet, weiter die höhere Reaktivität des Sphondins erklärt. Allerdings ist dies schwierig mit der Tatsache vereinbar, dass Angelicin mehr $^1\text{O}_2$ produziert, was aus dem Triplett-Zustand heraus erfolgt.

Xanthotoxol:

Analog zu Bergaptol war auch Xanthotoxol oder 8-Hydroxypsoralen in allen zellbasierten Assays negativ bezüglich Phototoxizität und -mutagenität. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen von Song und Ivie (vgl. Bergaptol) (Ivie 1978, Song et al. 1975). Auch in *C. reinhardtii* war Xanthotoxol weder phototoxisch noch -mutagen (Schimmer, Beck and Dietz 1980), ebenso in verschiedenen *E. coli*-Stämmen (Tuveson et al. 1986). Zytostatische Effekte unter Lichtausschluss, die von Gawron und Glowinski (1987) in HeLa-Zellen beobachtet wurden, wurden nicht festgestellt, womöglich aufgrund der kurzen Inkubationszeit von 30 min statt 24 h oder 48 h.

Beispiele, bei denen Xanthotoxol in Analogie zu Bergaptol als Radikalfänger von $\text{O}_2^{\bullet-}$ auftritt, sind in der Literatur vorhanden (Prasad et al. 2009, Xiao, Song and Liu 2010).

7.2 Allgemeine Faktoren zur Beeinflussung der Photoreaktivität

7.2.1 Struktur

7.2.1.1 Angulare / lineare Struktur

Im Furocumarin-Grundgerüst kann der Furanring entweder linear oder angular ankondensiert sein, was große Unterschiede in der phototoxischen / -mutagenen / -clastogenen Potenz hervorruft. Generell sind angulare Furocumarine weniger photobiologisch reaktiv als ihre linearen Vertreter (Musajo and Rodighiero 1972, Scott et al. 1976). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit auch für die beiden Isomere Psoralen und Angelicin gezeigt werden, wobei letzteres ca. 20-fach weniger phototoxisch, 10-fach weniger -mutagen und 40-fach weniger -clastogen war. Auch für 5-MOP und Isobergapten ist dies zutreffend: 5-MOP ist sogar das potenteste der getesteten Furocumarine, während Isobergapten nur im HPRT-Assay bis zu einem Plateau ab ca. 15 $\mu\text{g/ml}$ deutlich schwächer ansteigende Mutationsfrequenzen induziert und ansonsten nahezu inaktiv ist. Die Analogen Pimpinellin und Isopimpinellin sind beide nahezu inaktiv, wobei nur das lineare Isopimpinellin ein sehr geringes, jedoch nicht signifikantes photomutagenes Potential aufweist. Betrachtet man 8-MOP und Sphondin als Analoge, ist letzteres auch hier ca. 2,5-fach weniger phototoxisch und -mutagen und 11-fach weniger photoclastogen.

Diese Unterschiede rühren teilweise von der geringeren Photo-Bindungs-Affinität von Angelicinen gegenüber der DNA her, z.B. bildet Angelicin nur etwa ein Siebtel so viele Addukte an die DNA wie Psoralen (Rodighiero et al. 1970), wobei die Anzahl der gebundenen Furocumarin-Moleküle pro Nucleotid nicht zwingend mit den photobiologischen Effekten korreliert ist (Santana et al. 2000). Hauptsächlich rühren die

Unterschiede jedoch daher, dass lineare Furocumarine in der Lage sind, Interstrand-Crosslinks (ICL) auszubilden, während angulare nur Monoaddukte (MA) formen. ICL sind generell schwieriger zu reparieren (Bordin et al. 1991) und inhibieren die DNA-Synthese deutlich stärker. Persistente ICL sind somit häufig letal für die Zelle, während analoge MA leichter durch eine Reparatur zu beheben sind, die allerdings fehleranfällig ist und somit mutagene und kanzerogene Effekte auftreten können (Hanawalt, Liu and Parsons 1981, Mullen et al. 1982). Bei einer sehr hohen Anzahl an Addukten werden auch MA letal, was vermutlich auf Überlastung der Reparaturmechanismen zurückzuführen ist (Averbeck 1985). Das konnte an reparaturdefizienten Ataxia telangiectasia- und Xeroderma Pigmentosum-Zellen (Bordin et al. 1991) oder *S. cerevisiae* (Grant et al. 1979) gezeigt werden, wobei generell Reparaturmechanismen unterschiedlich ausgeprägt sein können und somit die mutagene Effizienz von MA gegenüber ICL speziesabhängig variieren kann (Laquerbe, Moustacchi and Papadopoulou 1995).

Laquerbe et al. (1995) konnten mit 4,5',8-Trimethylpsoralen durch eine zweistufige UVA-Bestrahlung erst in Gegenwart, dann in Abwesenheit von TMP an humanen Lymphoblasten zeigen, dass die Umwandlung von zuvor gebildeten MA in CL keine Zunahme der 6-TG-resistenten Mutanten, wohl aber eine starke Verringerung der Vitalität zur Folge hat. Babudri et al. (1981) zeigten an V79-Zellen mit 8-MOP in einem analogen Experiment ebenfalls eine starke Reduktion der Vitalität, fanden jedoch bei einer Reduktion der Plating Efficiency um 90 % eine Verhundertfachung der TG-resistenten Mutanten. Liu-Lee et al. konnten in einem ebenfalls analogen Experiment mit 8-MOP in L5178Y murinen Lymphomzellen wiederum keine Zunahme der 6-Thioguanin- oder 8-Azaguanin-resistenten Mutanten mit der Umwandlung von MA in ICL feststellen, wohl aber eine starke Erhöhung der SCE- und Mikrokernzahl. Sie folgerten, dass Interstrand-Crosslinks 10-20-fach effektiver Mikrokernne induzieren als entsprechende Monoaddukte und somit die biologischen Effekte nicht nur von der relativen Effizienz von MA und ICL resultieren, sondern auch von ihrer relativen Häufigkeit (Liu-Lee et al. 1984b).

Zusammengefasst bedeutet dies, dass je größer das phototoxische und -clastogene Potential eines Furocumarins oder Strukturverwandten im Vergleich zu seinem photomutagenen ist, desto größer ist der Anteil an Interstrand-Crosslinks gegenüber Monoaddukten. Dies konnte auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden: Alle monofunktionalen photoreaktiven Substanzen, d.h. Angelicin, Sphondin und das Cumarin Limettin, zeigten ein geringes phototoxisches und relativ zu 5-MOP ein 6-10-faches schwächeres photoclastogenes Potential pro Mol im Vergleich zum mutagenen Potential. Auch bezogen auf die Grundstruktur, Psoralen, ist das clastogene Potential 3-5-fach schwächer als das mutagene. Hingegen zeigen DHB, Epoxybergamottin, Oxypeucedanin und Oxypeucedaninhydrat pro Mol ein 2-4-fach größeres photomutagenes und 3-6-fach höheres phototoxisches als -clastogenes Potential. Im Vergleich zur Grundstruktur Psoralen kann ein 4-9-fach größeres photomutagenes und 4-7-fach höheres phototoxisches Potential festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass diese Furocumarine besonders gut in der Lage sind, durch Aufnahme eines zweiten Photons aus dem Monoaddukt ein Interstrand-Crosslink auszubilden (vgl. 7.2.1.2).

Weiterhin sind angulare Furocumarine generell mindestens genauso starke, wenn nicht stärkere Produzenten von $^1\text{O}_2$ und $\text{O}_2^{\cdot-}$ wie lineare (Joshi and Pathak 1983, Pathak and Joshi 1984). Dies stimmt auch mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen überein: Nach der Positivkontrolle Psoralen zeigten Angelicin, Sphondin und sogar das Cumarin

Limettin das größte Potential zur Photoproduktion von Singulett-Sauerstoff, während alle anderen getesteten Furocumarine deutlich weniger oder gar nicht in der Lage waren, $^1\text{O}_2$ zu bilden. Bezüglich der Bildung von Superoxidradikalanionen zeigt Limettin sogar das größte Potential nach Riboflavin, gefolgt von Sphondin. Isobergapten und Angelicin rangieren jedoch in der gleichen Größenordnung wie Psoralen und 5-MOP. Die so gebildeten ROS könnten zur Zellschädigung, Erythembildung und letztlich Kanzerogenität *in vivo* beitragen, da durch sie in der DNA promutagene oxidative Basenmodifikationen wie 8-Oxo-dG oder FaPy (vgl. 2.5.5.2.4) entstehen können (Joshi 1985, Joshi and Pathak 1983). Die Relevanz der durch ROS induzierten Effekte für die in dieser Arbeit verwendeten *in vitro* Testsysteme ist allerdings eher gering (Serrano-Perez, Merchan and Serrano-Andres 2008b), da die kovalente DNA-Bindung vorrangig für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Dafür sprechen die zumindest bei 5-MOP spät einsetzende Apoptose (Godar 1999), wobei 5-MOP eher geringfügige Mengen an ROS bildet (Pathak and Joshi 1984)(vgl. 7.5) oder die schnellere Reparatur oxidativer Basenmodifikation durch BER gegenüber der Reparatur sterisch anspruchsvollerer Addukte durch NER und somit eine Verringerung persistenter Modifikationen (Braithwaite, Wu and Wang 1999). Weiterhin kann dies durch die i.A. schnellere und leichtere Reparatur von Guanin-Modifikationen wie 8-oxo-dG gegenüber Schäden an den für Furocumarin-Addukt-Bildungen bevorzugten Thyminresten (Jenkins et al. 2005) erklärt werden oder auch durch die möglicherweise speziell in diesem System (V79, HPRT-Assay) schwächere Mutagenität im Vergleich zum sonst eher hohen mutagenen Potential von 8-Oxo-dG (Takeuchi, Matsugo and Morimoto 1997).

De Mol et al. (1981) fanden allerdings in einem für 8-MOP-induzierte photodynamische Effekte sensitiven *E.coli*-Stamm durch Zugabe des $^1\text{O}_2$ -Quenchers DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan) eine Verringerung der Mutagenität (Rückmutation der *arg*⁻-Mutante). Daraus folgerten sie, dass bis zu 40 % der Effekte in diesem System $^1\text{O}_2$ -vermittelt sein könnten. Sollte daher die Bildung von ROS für die Ausprägung der Effekte in den verwendeten *in vitro* Testsystemen doch relevant sein, würde vermutlich eine Erhöhung der phototoxischen und -mutagenen Potenz im Vergleich zur photoclastogenen auftreten, was hier aber nicht eindeutig beobachtet werden konnte, da sowohl FC-Monoaddukte als auch oxidative Basenmodifikationen eher die Mutagenität, weniger die Clastogenität erhöhen. Zwar können Singulett-Sauerstoff und Hydroxylradikale auch DNA-Einzelstrangbrüche, bei sehr hohen Konzentrationen sogar Doppelstrangbrüche induzieren (Klotz, Kroncke and Sies 2003, Brendler-Schwaab et al. 2004), aus denen auch Mikrokerne resultieren können. Inwiefern $^1\text{O}_2$ und $\text{O}_2^{\cdot-}$ im Vergleich zu der FC-Monoadduktbildung zum clastogenen Potential angularer Furocumarine beiträgt, kann in diesem Versuchsaufbau allerdings nicht geklärt werden.

7.2.1.2 Substituenten

Methylgruppen / Methoxygruppen:

Elektronen-schiebende Substituenten wie Methylgruppen an Position 5 oder 8 bei linearen Furocumarinen tragen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* generell zur Erhöhung der Reaktivität bei, eine Methylgruppe an Pos. 3, 4 oder 4' kann sie verringern (Musajo and Rodighiero 1972, Scott et al. 1976). Bei angularen Furocumarinen erhöht eine Methylgruppe an Pos. 4, 4', 5, 5', und 6 (Bordin et al. 1991) die Reaktivität, wobei die

Einführung einer zweiten oder dritten Methylgruppe zu einer weiteren Reaktivitätserhöhung führt (Rodighiero et al. 1970, Bordin et al. 1991, Dall'Acqua 1988, Venturini et al. 1981). Hierbei handelt es sich allerdings um synthetische FCs, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden. Im Gegensatz dazu sind Methoxygruppen in der Lage, die Reaktivität zu verringern (Musajo and Rodighiero 1972, Scott et al. 1976, Rodighiero et al. 1970). Dies konnte in dieser Arbeit für 5-Methoxypsoralen gegenüber dem unsubstituierten Psoralen, welches (pro Mol) 4-, 3,5- und 6,5-fach geringere PTEF-, PMEF- und PCEF-Werte aufweist, nicht gezeigt werden. 8-Methoxypsoralen ist jedoch gegenüber Psoralen etwas schwächer phototoxisch (PTEF 0,2 vs. 0,24) und -mutagen (PMEF 0,24 vs. 0,28), jedoch etwas stärker photoclastogen (PCEF 0,16 vs. 0,14). Die Einführung zweier Methoxygruppen an Pos. 5 und 8 hingegen führt, wie bei Isopimpinellin, zu vollständigem Verlust der Photoreaktivität, ebenso wie die Methoxygruppe an Pos. 5 bei dem photoreaktiven Imperatorin, da Phellopterin ebenfalls unreaktiv ist. Vermutlich ist dies auch der Grund für die Inaktivität von Byakangelicin, wofür leider der direkte Vergleich mit der unmethoxylierten Variante nicht gezogen werden kann, wohl aber mit dem verwandten Imperatorin und dem epoxydierten Heraclenin, die beide photoreaktiv sind. Bei den angularen Vertretern bewirkt die Einführung einer Methoxygruppe an Pos. 6 (Sphondin) gegenüber Angelicin ebenfalls eine Erhöhung der Reaktivität; Sphondin weist etwa 5,5-, 3- und 5-fach höhere PTEF-, PMEF- und PCEF-Werte auf. Wie eine Methoxygruppe an Pos. 5 zu bewerten ist, kann aufgrund der widersprüchlichen Effekte von Isobergapten nicht eindeutig geklärt werden. Im Fall von Pimpinellin konnte jedoch gezeigt werden, dass die an den Positionen 5 und 6 dimethoxylierte Verbindung den Komplettverlust der Photoreaktivität aufweist. Somit kann nach Betrachtung der Ergebnisse von Pimpinellin und Isopimpinellin gefolgert werden, dass prinzipiell die Photoreaktivität mit steigender Zahl der Methoxygruppen abnimmt.

Hydroxygruppen:

Stark elektronenziehende Gruppen wie Cyano- und Nitro-Gruppen reduzieren drastisch oder eliminieren völlig die Photoreaktivität der FC. Auch Hydroxy-, Amino- oder Acetylamino-Gruppen bewirken diese Effekte (Cimino et al. 1985, Scott et al. 1976). Hydroxypsoralene mit einer OH-Gruppe an Pos. 5 oder 8 wie Bergaptol oder Xanthotoxol sind als Photosensitizer inaktiv, was auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, d.h. sie bilden keine Photoaddukte an die DNA oder andere Biomoleküle (Kitamura, Kohtani and Nakagaki 2005, Musajo and Rodighiero 1972). Nach Anregung durch UVA-Strahlung kommt es zur Dissoziation des Protons der aromatischen Hydroxygruppe, die eine Konkurrenzreaktion zum Intersystem-Crossing vom ersten angeregten Singulett-Zustand S_1 zum reaktiven Triplett-Zustand T_1 darstellt. Das Fehlen von Phosphoreszenz lässt auf ein ineffektives $S_1 \rightarrow T_1$ und/oder effektives $T_1 \rightarrow S_0$ Intersystem-Crossing schließen. Zudem sind die T_1 -Zustände der Anionen deutlich delokalisiert als die der neutralen Psoralene, deren T_1 -Zustände an der 3,4-DB bzw. über Ladungstransfer an der 4',5'-DB lokalisiert sind, was Hydroxypsoralene völlig unreaktiv macht (Anders et al. 1983, Song et al. 1975). Ein nicht besetzter FC- T_1 -Zustand erklärt auch, wieso keine Reaktionen vom Typ II mit molekularem Sauerstoff stattfinden und somit keine Bildung von 1O_2 detektiert werden konnte (Kitamura et al. 2005). Die verminderte Bildung des NBT-Formazans durch $O_2^{\bullet -}$ im Vergleich zur Kontrolle erklärt sich durch das Abfangen des durch DMSO gebildeten Radikals durch die Hydroxygruppe am aromatischen Ring. Eine negative

Ladung des Sauerstoffs kann so über den Ring mesomeriestabilisiert werden, weshalb sie als Protonendonator fungieren kann und so $O_2^{\cdot-}$ über folgende Reaktion abgefangen werden kann: $2 H^+ + 2 O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (Prasad et al. 2009, Siddhuraju et al. 2002).

Sterisch anspruchsvolle Seitenketten:

Nach Musajo und Rodighiero (1972) nimmt graduell mit steigender Länge der Seitengruppe die Reaktivität bis auf null ab; sie fanden folgende Reihenfolge für die Reaktivität: Methoxy > Ethoxy > Isopropoxy > Benzyloxy. Generell verringern sterisch anspruchsvolle oder elektronenziehende Gruppen die Fähigkeit zur Cycloaddition der 3,4-DB oder 4',5'-DB (Viola et al. 2009). Aubin et al. (1994) postulierten, dass die geringen phototoxischen Effekte von Bergamottin *in vivo* möglicherweise auf ROS zurückzuführen sind, da aufgrund der sterischen Hinderung durch den Geranoxysubstituenten eine Interkalation im Dunkeln nicht gezeigt werden konnte und auch die für lineare Furocumarine typischen Crosslinks nicht gefunden werden konnten. Dennoch erhöhen positiv geladene und relativ sperrige Gruppen an Pos. 4' oder 5 sehr stark die Komplexbildungskonstante zwischen Furocumarin und DNA und führen zu einer hohen Photoreaktivität (Cimino et al. 1985). Auch Möller et al. (1995) zeigten eine photoinduzierte Erhöhung der Zahl mikrokerntragender Zellen und Mutationsfrequenz in L5178Y tk^{+/−} Maus-Lymphom-Zellen und AS52 CHO-Zellen durch FC-Derivate mit sterisch anspruchsvollen Substituenten wie einer 3-Hydroxy-3-methyl-1-butenyl-Gruppe an Pos. 5 oder 2-Hydroxy-3-methyl-3-butenyloxy-Gruppe an Pos. 8. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FCs mit sterisch anspruchsvolleren Seitenketten wie Bergamottin (Bgm), 6',7'-Dihydroxybergamottin (DHB), Epoxybergamottin (EpB), Isoimperatorin (IsI), Oxypeucedanin (Oxp) und Oxypeucedaninhydrat (OxH) bzw. Heraclenin und Imperatorin gegenüber ihren kurzkettigeren Vertretern 5-MOP bzw. 8-MOP eine deutlich geringere Photoreaktivität aufweisen. Hierbei ist sowohl bei den beiden Epoxiden EpB und Oxp, den dihydroxylierten FCs DHB und OxH und den Alkenen Bgm und IsI eine Verminderung der phototoxischen und -mutagenen Potenz mit steigender Kettenlänge zu erkennen, wobei Isoimperatorin aufgrund der ungewöhnlichen Dosis-Wirkungs-Beziehungen schwierig zu beurteilen ist. Allerdings findet sich dieser Trend nicht im clastogenen Potential wieder: Dieses ist zwar allgemein geringer als das von 5-MOP, schwankt aber unabhängig von der Kettenlänge zwischen 0,14 (EpB) und 0,26 (DHB); Bergamottin ist nahezu inaktiv.

Bei einer Substitution an Pos. 8 bewirkt die Doppelbindung (Imperatorin) zwischen C^{2'} und C^{3'} der Butyloxy-Gruppe gegenüber dem Epoxid (Heraclenin) in etwa eine Verdopplung der Photoreaktivität in allen drei zellbasierten Assays. Dieser Trend kann bei einer Substitution an Pos. 5 nicht festgestellt werden: Während Bergamottin und Isoimperatorin keine bzw. geringe und atypische Effekte zeigen, weisen die beiden Epoxide EpB und Oxp gegenüber ihren dihydroxylierten Vertretern eine fast doppelt so hohe Phototoxizität auf, dagegen fast gleiche photomutagene Eigenschaften. Ähnliches trifft bei Oxp und OxH auch auf die photoclastogenen Eigenschaften zu, wohingegen DHB mit zwei Hydroxygruppen in der Seitenkette unerwarteterweise einen fast doppelt so hohen PCEF_{μM} hat wie EpB hat.

Als mögliche Ursache für die verminderte Reaktivität gegenüber dem kurzkettigen 5-MOP kann eine verminderte Interkalationsfähigkeit zwischen die Basen der DNA aufgrund möglicher sterischer Hinderung (Aubin, Humbert and Agache 1994, Schimmer and Abel 1986) ausgeschlossen werden, da nach dem kurvenförmigen Verlauf der

Absorptionsmessungen aus 6.7 und den Ergebnissen von Cimino et al. (1985) auf eine hohe Komplexbildungskonstante geschlossen werden kann. Ob eine sterisch anspruchsvolle Seitenkette generell die Aufnahme in die Zelle erschwert, kann aufgrund der Daten nicht beurteilt werden; auch sind Literaturdaten zu einem anderen Transportmechanismus als Diffusion nicht gegeben. So kann aufgrund mangelnder Datenlage nur spekuliert werden, dass die Ursache in einer verkürzten Lebensdauer oder geringerer Population des reaktiven Zustands liegt. Schließlich sind die Absorptionsmaxima ebenso wie deren Rotverschiebung in Gegenwart von DNA_{DS}, zumindest in wässrigem Puffer, mit denen von 5-MOP nahezu identisch, weshalb eine mangelnde Lichtabsorption aufgrund ungeeigneter Wellenlängen unwahrscheinlich ist. Aufgrund der starken Rotverschiebung des Absorptionsmaximums von bis zu 10 nm kann auf eine leicht beeinflussbare Elektronendichte durch die sterisch aufwändigen Gruppen geschlossen werden, weshalb eine leichte Verschiebung der Anregung der Pyron-DB über Charge Transfer zur Furan-DB gut möglich erscheint. Dies könnte das erhöhte photoclastogene und -toxische Potential dieser Verbindungen im Vergleich zu ihrem photomutagenen erklären: Abgesehen davon, dass 4',5'-Cycloaddukte möglicherweise schwieriger zu reparieren sind als 3,4-Addukte (Bordin et al. 1991), sind nur diese bei einer Bestrahlungswellenlänge von 365 nm in DNA-Interstrand-Crosslinks überführbar (Liu-Lee, Heddle and Arlett 1984a, Scott et al. 1976). Werden also mehr 4',5'-Addukte gebildet, steigt der Anteil an ICLs pro Addukt. Diese führen, wie schon unter 7.2.1.1 ausgeführt, zur Erhöhung der Zytotoxizität und Mikrokernanzahl, nicht aber der Mutationsfrequenz (Laquerbe et al. 1995, Liu-Lee et al. 1984b). Daher kann zusammenfassend geschlossen werden, dass zumindest die sterisch anspruchsvollen Seitenketten an Pos. 5 der hier getesteten FCs zwar zu einer generellen Verminderung der Photoreaktivität, aber dennoch zu einer Erhöhung des ICL-Anteils der Cycloaddukte führen.

Epoxygruppen:

Eine schwache Mutagenität, wie sie durch Heraclenin und Oxypeucedanin in *S. typhimurium* (Ivie et al. 1980) oder durch Heraclenin in humanen Lymphozyten nach 48 h Inkubationszeit verursacht wurde (Abel and Schimmer 1986), konnte bei keinem der verwendeten epoxydierten FCs, also Epoxybergamottin, Heraclenin und Oxypeucedanin beobachtet werden. Dies könnte an der kurzen Inkubationsdauer oder einer womöglich relativ hohen Stabilität der Epoxygruppe der FCs liegen. Lediglich für Epoxybergamottin ist unter Lichtausschluss im Resazurin-Reduktionstest eine gewisse Toxizität feststellbar ($EC_{50} = 65,3 \pm 7,9 \mu\text{g/ml}$), die möglicherweise auf eine Reaktion der Epoxygruppe mit den Thiol- oder primären/sekundären Aminogruppen verschiedener Aminosäuren zurückzuführen ist (Hermens 1990). Dennoch sind mögliche Addukte durch die große Nähe der Epoxygruppe nach der Interkalation zu den DNA-Basen nicht völlig auszuschließen. Diese Addukte sind jedoch durch die hohen Schwankungen der spontanen Mutationsfrequenz / Mikrokernanzahl nicht eindeutig zu detektieren und / oder konnten durch nicht überlastete zelleigene Reparatur (NER) beseitigt werden.

Bezüglich der Photoreaktivität ist kein eindeutiger Trend zu beobachten: Während in arg⁻ und std^d Mutanten von *C. reinhardtii* keine signifikanten Unterschiede in der Phototoxizität und -mutagenität von Imperatorin und Heraclenin beobachtet wurden (Schimmer and Abel 1986), zeigte Imperatorin hier ein mindestens doppelt so starkes phototoxisches, -mutagenes und -clastogenes Potential gegenüber Heraclenin mit einer Epoxygruppe.

Epoxybergamottin ist jedoch gegenüber dem nahezu unreaktiven Bergamottin deutlich potenter, während gegenüber dem dihydroxylierten DHB kaum Unterschiede in der Mutagenität, wohl aber eine 1,5-fach bzw. zweifach höhere Toxizität und Clastogenität zu finden sind. Bei Oxypeucedanin und Oxypeucedaninhydrat finden sich ähnliche PMEF- und PCEF-Werte, der PTEF von Oxp ist jedoch gegenüber OxH doppelt so groß. Somit kann im Rahmen dieser Arbeit kein eindeutiger Trend über den Einfluss einer Epoxygruppe auf die Photoreaktivität von Furocumarinen formuliert werden.

Vergleich der Substitution an Position 5 gegenüber Position 8 linearer FCs:

In der Literatur finden sich im Allgemeinen nur Beschreibungen der Modifikation der Photoreaktivität durch Substituenten an Pos. 5 und 8 gegenüber anderen, z.B. Pos. 4 oder 4', des Grundgerüsts; direkte Vergleiche sind kaum zu finden und/oder oft widersprüchlich und beziehen sich meist nur auf 5-MOP und 8-MOP. So fanden z.B. die gleichen Autoren in *S. cerevisiae* einmal für 5-MOP, dann für 8-MOP eine höhere phototoxische Potenz (Averbeck, Averbeck and Dall'Acqua 1981, Averbeck et al. 1990b). Dennoch kann im Rahmen dieser Arbeit ein gewisser Trend beobachtet werden: Vergleicht man die Stellungsisomeren 5-MOP und 8-MOP, findet sich bei dem an Pos. 8 substituierten Vertreter ein 5-, 4- bzw. 6-fach schwächeres phototoxisches, -mutagenes bzw. -clastogenes Potential. Ebenso finden sich bei Oxypeucedanin und Heraclenin 6-, 1,2- bzw. 4-fache Abstufungen. Offenbar ist die Photoreaktivität des an Pos. 8 substituierten Stellungsisomers deutlich schwächer ausgeprägt als die des an Pos. 5 substituierten. Analoge Beobachtungen an Imperatorin und Isoimperatorin gestalten sich aufgrund der atypischen Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Isoimperatorin als schwierig; die stark verringerte Phototoxizität und -mutagenität sprechen gegen diese Theorie, die im Bereich niedriger Substanz-Konzentrationen stark ansteigende Zahl mikrokerntragender Zellen dafür.

7.2.2 Lipophilie

Der initiale Schritt zur Photoaddukt-Bildung ist die Ausbildung des FC-DNA-Komplexes im Dunkeln. Es konnte eine klare Korrelation am Beispiel verschieden methylierter Furocumarine in Kombination mit isolierter DNA zwischen dem $\log P_{OW}$ (Bordin et al. 1991, Caffieri 2001) oder der Wasserlöslichkeit $\log S$ (Dall'Acqua et al. 1981) und der Komplex-Bildungskonstante gezeigt werden. Weiterhin wurde mit dem $\log P_{OW}$ ebenfalls eine Zunahme der Photoreaktivität an reiner DNA beschrieben (Caffieri et al. 1994, Rodighiero et al. 1970). Mit Hilfe des Programms OSIRIS Property Explorer konnten die Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten berechnet werden. Auch stimmte die berechnete Löslichkeit in Wasser tendenziell recht gut mit den experimentellen Beobachtungen überein, ein Vergleich mit den Daten aus der Absorptionsverringerng / Rotverschiebung des Absorptionsmaximums (6.7) erscheint aufgrund mangelnder Absolutwerte nicht sinnvoll. Zieht man die Literaturwerte für 8-MOP und Limettin hinzu (Ou et al. 1978), zeigt sich eine gewisse Übereinstimmung in dem Zusammenhang zwischen Lipophilie, Löslichkeit und DNA-Affinität, was sich allerdings mit der vorhandenen Datenqualität nicht verallgemeinern lassen kann: Limettin zeigt gegenüber 8-MOP kleinere Werte für $\log P_{OW}$ (1,74 \leftrightarrow 2,24) und $\log S$ (-2,41 \leftrightarrow -3,55), ein höheres FC-Nukleotid-Verhältnis (1:160 \leftrightarrow 1:40), eine mit steigender DNA_{DS} -Konzentration lineare Rotverschiebung des

Absorptionsmaximums statt der Annäherung an ein Plateau und geringere Photoreaktivität in den zellbasierten Assays. Allerdings ist die Übertragung der Ergebnisse mit isolierter DNA auf eine intakte Zelle ebenfalls mit Schwierigkeiten verbunden: Hier, oder auch *in vivo*, reagieren Furocumarine nicht nur mit der DNA, sondern auch mit anderen Zellkomponenten.

So fand sich bei 8-MOP eine prozentuale Adduktverteilung von 17 % an DNA/RNA, 57 % an Proteine und 26 % an Lipide. Das lipophilere 4,6,4'-Trimethylangelicin addierte hingegen deutlich stärker an Lipide, weniger an DNA (Dall'Acqua and Martelli 1991, Schoonderwoerd et al. 1991). Daher könnten mit steigender Lipophilie der FCs möglicherweise eine geringere Photomutagenität und -clastogenität im Vergleich zur Phototoxizität einhergehen, da hier vermehrt z.B. Zellmembranen oder andere überlebenswichtige lipophile Zellkomponenten im Vergleich zur DNA geschädigt werden könnten. Derartige Effekte oder Trends können innerhalb der hier erzielten Ergebnisse allerdings nicht beobachtet werden: Es zeigt sich weder eine generelle Zunahme der Phototoxizität mit steigender Lipophilie noch eine erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zur Mutagenität oder Mikrokernbildung. Daher spielt die Lipophilie in diesem Testsystem im Vergleich zu anderen Einflüssen, wenn überhaupt, nur eine sehr untergeordnete Rolle.

7.2.3 Weitere Faktoren und Ausblick

In Abhängigkeit von den Substituenten können erhebliche Varianzen bezüglich der Elektronenverteilung und somit auch Bindungslängen im Furocumarinmolekül auftreten, sowohl im Grundzustand als auch in den angeregten Zuständen (Nakai et al. 2003). Dies hat Konsequenzen für die Lage der Absorptions- und Emissions-Maxima, also die Lage der Energieniveaus der Singulett- und Triplett-Zustände, sowohl absolut als auch relativ zueinander, was bei gegebener Anregungswellenlänge Auswirkungen auf die Quantenausbeute Φ , Effizienz des ISC, Lebensdauer der angeregten Zustände etc. hat (Mantulin and Song 1973, Serrano-Perez, Serrano-Andres and Merchan 2008c, Serrano-Perez et al. 2008a). So führen z.B. starke Charge-Transfer-Substituenten wie eine Hydroxygruppe an Pos. 5 im Gegensatz zu einer Methylgruppe zu einer Rotverschiebung der 0-0-Phosphoreszenz-Bande, also zur Verringerung des energetischen Abstands zwischen T_0 und S_0 -Zustand. Weiterhin führt eine Hydroxygruppe an Pos. 3 zu einer Rotverschiebung, an Pos. 4 resultiert jedoch eine Blauverschiebung der 0-0-Phosphoreszenz-Bande (Mantulin and Song 1973). So sind die Unterschiede in der Photoreaktivität in Abhängigkeit der Substituenten und deren Position erklärbar, ebenso die Abhängigkeit der Quantenausbeuten Φ von der Anregungswellenlänge (Rodighiero et al. 1970).

Um jedoch konkretere Aussagen über den Zusammenhang zwischen Struktur und Reaktivität treffen zu können, sollte eine computergestützte Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehung herangezogen werden, das sog. QSAR-Modelling (Quantitative structure activity relationship). Hierbei können sowohl für freie als auch komplexierte Furocumarinmoleküle Aussagen über Elektronenverteilung, Bindungs-Längen und -Winkel, Absorptionsmaxima, Lage der Energieniveaus etc. in Abhängigkeit der Struktur getroffen werden und diese in Relation zu ihrer Reaktivität gesetzt werden (Kubinyi 1997).

7.3 Zusammenfassende Diskussion des PXEF-Konzepts

7.3.1 Ausnutzung linearer Zusammenhänge für PMEF- / PCEF-Konzept

Sowohl im HPRT-Assay (6.4) als auch im Mikrokerntest (6.5) ergeben sich, ausführlich dargestellt am Beispiel von 5-MOP, strikt lineare Zusammenhänge zwischen den untersuchten Effekten (Mutationsfrequenz und MNZ-Zahl) in Abhängigkeit von sowohl steigender 5-MOP-Konzentration bei fixer UVA-Dosis als auch fixer 5-MOP-Konzentration und steigender UVA-Dosis. Dies stimmt mit der Annahme direkter Proportionalität überein. Ähnliche Beschreibungen des strikt linearen Zusammenhangs sind auch vielfältig in der Literatur zu finden; Tab. 7.3.1 gibt eine Übersicht:

Tab. 7.3.1: Strikt lineare Zusammenhänge in der Literatur in Analogie zu den hier gefundenen Ergebnissen

Biologisches System	Substanz / Dosis	UVA-Strahlung/ Dosis	Quelle
Isolierte Kalbthymus-DNA, FC-DNA-Komplexbildung	5-MOP, Löslichkeit	(DNA-Konz., variabel)	(Musajo and Rodighiero 1972, Musajo et al. 1965)
V79-Zellen, HPRT-defiziente Mutanten	Div. ethylierende Substanzen (ENNG, ENU, DES, EMS), variabel	keine	(Van Zeeland et al. 1989)
Div. humane Fibroblasten, DNA-Addukte	8-MOP, 10 µg/ml, konstant	0-3000 mJ/cm ² , variabel	(Gruenert et al. 1985)
	Angelicin, 0-25 µg/ml, variabel	750 mJ/cm ² , konstant	
Div. humane Fibroblasten, DNA-Crosslinks	5-MOP, 8-MOP, 25 µg/ml, konstant	0-4500 mJ/cm ² , variabel	
	5-MOP, 8-MOP, 0-25 µg/ml, variabel	750 mJ/cm ² , konstant	
CHO-Zellen, DNA-Addukte & SCE	8-MOP, 7,4 µmol, konstant	variabel	(Cassel and Latt 1980)
HWF diploide humane Lymphoblasten, 6-TG ^r -Mutanten	8-MOP, 7-120 µmol, variabel	6 mJ/cm ² , konstant	(Chiou and Yang 1995)
V79-Zellen, 6-TG ^r -Mutanten	8-MOP, 5 µg/ml, konstant	variabel	(Babudri et al. 1981)
Arg ⁻ <i>C. reinhardtii</i> , Rückmutation	5-MOP, 8-MOP, Heraclenin, Imperatorin, 5 µg/ml, konstant	0-1000 mJ/cm ² , variabel	(Schimmer 1981, Schimmer and Abel 1986)
Jac humane Fibroblasten, DNA-Addukte & UDS	8-MOP, 10 µmol, konstant	0-2400 mJ/cm ² , variabel	(Nocentini 1986)
Diploide Hefe, DNA-Addukte	5-MOP, 8-MOP, 5 µmol, konstant	0-1/2,5 J/cm ² , variabel	(Averbeck 1985)
Diploide Hefe, DNA-Addukte und -Crosslinks	8-MOP, 50 µmol, konstant	0-1000 mJ/cm ² , variabel	(Averbeck et al. 1990b)
WM-266-4 humane Melanomzelllinie, DNA-Crosslinks	8-MOP, 0,5 µg/ml, konstant	0-5000 mJ/cm ² , variabel	(Cao et al. 2008)

In Tab. 7.3.1 sind verschiedene Literaturquellen aufgeführt, in denen die Dosis-Wirkungsbeziehungen aller relevanten Schritte wie DNA-Komplexbildung unter Lichtausschluss (Musajo and Rodighiero 1972, Musajo et al. 1965), DNA-Addukt-Bildung (Averbeck 1985, Averbeck et al. 1990b, Cassel and Latt 1980, Gruenert et al. 1985, Nocentini 1986) und Ausbildung von Interstrand-Crosslinks (ICL) unter Lichteinfluss (Averbeck et al. 1990b, Gruenert et al. 1985) einem strikt linearen Verlauf folgen. Dies geschieht sowohl bei variabler Substanzkonzentration und fixer UVA-Dosis als auch umgekehrt. Die Menge an interkalierten FCs steht mit den in Lösung befindlichen im Gleichgewicht, weshalb mit steigender FC-Konzentration im Medium auch die Menge an interkalierten Molekülen zunimmt und somit die Wahrscheinlichkeit, mit einem Photon in Wechselwirkung zu treten und ein Monoaddukt bzw. gegebenenfalls ein ICL auszubilden. Diese Wahrscheinlichkeit wird ebenfalls durch eine höhere Strahlungsdosis und somit höhere Photonenmenge gesteigert, was die UVA-Dosisabhängigkeit erklärt.

Auch verschiedene (photochemisch induzierte) Effekte wie Mutationen im *hprt*-Gen, Schwester-Chromatid-Austausche (SCE) oder unscheduled DNA synthesis (UDS) in unterschiedlichen biologischen Systemen, z.B. Hefen, *C. reinhardtii*, humanen Lymphoblasten und Fibroblasten oder CHO- und V79-Zellen, zeigen somit eine strikt lineare Abhängigkeit sowohl von der Substanzkonzentration als auch von der UVA-Dosis. Diese Abhängigkeit konnte an verschiedenen Furocumarinen, z.B. 5-MOP, 8-MOP, Angelicin, Heraclenin oder Imperatorin beobachtet werden. Diese in der Literatur beschriebenen Beobachtungen befinden sich somit in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit an V79-Zellen gezeigten Ergebnissen: Sowohl bei der Ausbildung von HPRT-defizienten Mutanten (6.4) als auch der Mikrokerninduktion (6.5) konnten sowohl für fast alle photochemisch aktiven Furocumarine konzentrations- als auch exemplarisch für 5-MOP UVA-dosisabhängige strikt lineare Zusammenhänge im nicht zytotoxischen Bereich gezeigt werden. Durch den Vergleich mit der Literatur kann somit geschlossen werden, dass alle hier getesteten Furocumarine analoge konzentrations- und UVA-dosisabhängige DRCs zeigen, da weiterhin ebenfalls alle der Ausbildung der biologischen Effekte vorausgehenden Schritte wie DNA-Komplexbildung, Monoaddukt- und gegebenenfalls DNA-ICL-Bildung den gleichen linearen Zusammenhängen unterliegen. Zusammenfassend für die Ergebnisse des HPRT-Genmutationstests und Mikrokerntest, wie in 6.4 und 6.5 bereits erwähnt, kann somit festgehalten werden: Die Ausprägung der untersuchten Effekte $[Effekt]_{MF/MN}$ kann als Funktion der beiden variablen Parameter (Furo-)cumarin-Konzentration $[Konz.]_{FC}$ und UVA-Dosis $[UVA-Dosis]$ unter Einführung eines Proportionalitätsfaktors f wie folgt dargestellt werden:

$$[Effekt]_{MF/MN} = f * [UVA - Dosis] * [Konz.]_{FC}$$

Der Proportionalitätsfaktor f kann somit berechnet werden nach:

$$f = \frac{[Effekt]_{MF/MN}}{[UVA - Dosis] * [Konz.]_{FC}}$$

Es sind somit zwei Möglichkeiten der Berechnung von f unter Ausnutzung einer linearen Dosis-Wirkungs-Kurve möglich: Entweder wird die Steigung der Linearregression der Auftragung $[Effekt]_{MF/MN}$ gegen variable FC-Konzentrationen bei fixer UVA-Dosis durch

die UVA-Dosis dividiert oder umgekehrt. In der praktischen Handhabung sind allerdings variable FC-Konzentrationen bei einer fixen UVA-Dosis leichter zu realisieren, da alle Gewebekulturschalen eines Experiments zeiteffektiv gleichzeitig bestrahlt werden können und somit weiterhin eine identische UVA-Dosis garantiert ist. Daher wurde sich in dieser Arbeit entschieden für eine Berechnung von f nach:

$$f = \frac{\text{Steigung}_{[UVA-Dosis]=\text{konst.}}}{[UVA - Dosis]}$$

Wie bereits im Ergebnisteil (Kap. 6) sowohl für den HPRT- als auch Mikrokern-Assay am Beispiel von 5-MOP gezeigt wurde, ist der Proportionalitätsfaktor über den getesteten UVA-Dosis-Bereich zwischen 50 und 200 mJ/cm² relativ stabil und lässt keine eindeutige UVA-dosisabhängige Varianz erkennen. Somit kann sich ohne erkennbaren Fehler die relative photomutagene und -clastogene Potenz verschiedener Furocumarine bei einer nach praktischen Gesichtspunkten ausgewählten fixen UVA-Dosis von 125 mJ/cm² berechnen und vergleichen lassen unter der Annahme, dass f auch für andere Furocumarine bei variabler Substanz-Konzentration und UVA-Dosis konstant ist. Ein Vergleich mit der Literatur kann diese Folgerung bestätigen: Führt man analoge Berechnungen des Proportionalitätsfaktors f mit den Daten von Kersten et al. zur Mikrokerninduktion durch Angelicin und 8-MOP in Kombination mit 100 und 400 mJ/cm² UVA-Licht in V79-Zellen durch, ergeben sich für Angelicin nahezu identische f von 0,08 und 0,10, bei 8-MOP ergeben sich f von 1,64 und 4,4 (Kersten et al. 2002, Kersten et al. 1999). Dieser Unterschied kann durch die Wahl der FC-Konzentration in halblogarithmischen Intervallen erklärt werden, weshalb die genaue Konzentration, ab der ein linearer Zusammenhang nicht mehr gegeben ist, und somit eine Regressionsgerade nicht exakt dargestellt werden können. Dennoch stimmen sie in der Größenordnung überein. Somit kann prinzipiell auch hier eine gute Übereinstimmung der Proportionalitätsfaktoren bei variabler FC-Konzentration / UVA-Dosis angenommen werden, was die o.g. Schlussfolgerungen bestätigt.

Daher kann, wenn alle Untersuchungen mit der identischen UVA-Dosis von 125 mJ/cm² durchgeführt werden, unter Ausnutzung der linearen DRC und der UVA-Dosis-Unabhängigkeit der relativen Potenz, die relative photomutagene und -clastogene Potenz direkt über den Vergleich der Regressionsgeraden der Auftragung der Mutationsfrequenz bzw. der Zahl mikrokerntragender Zellen gegen die FC-Konzentration bestimmt werden. Da 5-MOP in dem hier verwendeten *in vitro*-Testsystem das potenteste Furocumarin ist und somit die Potenz aller anderen FCs auf 5-MOP als „Index-Stoff“ normiert wird, können die Photomutagenitäts- und Photoclastogenitäts-Äquivalenzfaktoren (Photomutagenicity resp. Photoclastogenicity equivalency factors, PMEFs resp. PCEFs) berechnet werden nach:

$$PMEF_{FC} \text{ bzw. } PCEF_{FC} = \frac{\text{Steigung}_{\text{Furocumarin}}}{\text{Steigung}_{5\text{-MOP}}}$$

Über diese Formel können somit die PMEFs bzw. PCEFs, wie unter 6.4 und 6.5 gezeigt, für jedes photochemisch aktive Furocumarin berechnet und zugeordnet werden. So könnte die kombinierte photomutagene und -clastogene Potenz künstlicher und sogar natürlich

vorkommender FC-Mischungen als 5-MOP-Dosis-Äquivalente (PXEQ) berechnet werden nach:

$$PXEQ_{gesamt} = \sum_{i=1}^n D_i \times PXEF_i$$

Mit: $PXEQ_{gesamt}$ = Gesamt-Photo-Mutagenitäts-/Clastogenitäts-Äquivalente aller Komponenten der Mischung, bezogen auf 5-MOP

D_i = Dosen der Substanzen 1 bis n

$PXEF_i$ = Photo-Mutagenitäts-/Clastogenitäts -Äquivalenz-Faktoren der Substanzen 1 bis n

Dies geschieht jedoch unter Annahme eines dosisadditiven Verhaltens und musste zunächst überprüft werden. Unter 6.4 und 6.5 konnte dieses Verhalten gezeigt werden und unter 7.4 wird es näher erläutert werden. Dort wird nicht nur geklärt, ob dieses PXEF-Konzept auf alle Furocumarine anwendbar ist, sondern auch auf strukturell verwandte Verbindungen wie Limettin oder möglicherweise Khellin, wäre es in diesen System photochemisch aktiv. In diesem Zusammenhang, was nicht mehr Teil dieser Arbeit war, sollte die Anwendbarkeit auf strukturell unterschiedliche, natürlich vorkommende photoaktive Substanzen überprüft werden. Dazu gehören z.B. die ebenfalls UVA-induziert DNA-bindenden Furochinoline Dictamnin, γ -Fagarin oder Skimmianin aus der Gartenraute (*Ruta graveolens* L.) (Ashwood-Smith et al. 1982, Schimmer, Kiefer and Paulini 1991, Schimmer and Kühne 1990), oder das in Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) vorkommende Hypericin, dessen phototoxische und photogentoxische Wirkung hauptsächlich sauerstoffabhängig durch Rotlicht induziert wird (Agostinis et al. 2002, Roelants et al. 2009). In letzterem Fall muss allerdings nicht nur eine mögliche Abweichung von der Additivität aufgrund möglicher unterschiedlicher Mechanismen und Targets berücksichtigt werden, sondern auch die abweichende Anregungswellenlänge von 620-800 nm. Denkbar wäre, sollte z.B. eine Exposition gegenüber Tageslicht untersucht werden, eine Berechnung der PXEQ unter Einführung eines zusätzlichen multiplikativen Faktors zwischen 0 und 1, der die relative Verteilung / Intensität der spektralen Anteile im Sonnenlichtspektrum berücksichtigt.

7.3.2 PTEF-Konzept

Die Dosis-Wirkungsbeziehungen im Resazurin-Reduktionstest bei konstanter UVA-Dosis mit der Auftragung „relative Vitalität“ gegen variable Substanz-Konzentration verlaufen nicht linear wie im HPRT- oder Mikrokern-Assay. Dennoch, sofern durch das jeweilige Furocumarin eine entsprechend hohe Phototoxizität gezeigt wurde, ist die DRC bei allen FCs ähnlich und die Vitalitätsabnahme entspricht einem sigmoidalen Verlauf. Die DRC kann nicht über die Steigung der Regressionsgeraden, sondern über den EC_{50} -Wert charakterisiert werden, weshalb eine zu den PMEF- und PCEF-Werten analoge Behandlung der Zytotoxizitätsdaten trotz des nicht-linearen Verlaufs schlüssig scheint. So kann der Phototoxizitäts-Äquivalenzfaktor (Phototoxicity equivalency factor, PTEF) berechnet werden nach:

$$PTEF_{Furocumarin} = \frac{EC_{50,5-MOP}}{EC_{50,Furocumarin}}$$

Daher folgt für die Berechnung der kombinierten phototoxischen Potenz von FC-Mischungen als 5-MOP-Dosis-Äquivalente (PTEQ):

$$PTEQ_{gesamt} = \sum_{i=1}^n D_i \times PTEF_i$$

Mit: $PTEQ_{gesamt}$ = Gesamt-Phototoxizitäts-Äquivalente aller Komponenten der Mischung, bezogen auf 5-MOP

D_i = Dosen der Substanzen 1 bis n

$PTEF_i$ = Phototoxizitäts-Äquivalenz-Faktoren der Substanzen 1 bis n

7.4 Diskussion der Mischungen

Die Anwendung eines TEF-Konzepts ist nach allgemeineren Annahmen generell nur möglich, wenn die einzelnen Komponenten einer Mischung nach dem gleichen Wirkmechanismus agieren, d.h. toxikologische Ähnlichkeiten und gleichwertige toxikologische Endpunkte vorliegen, oder sich die Komponenten in ihrer Wirkung additiv verhalten und parallele DRCs aufweisen (Reffstrup, Larsen and Meyer 2010, Safe 1998, US-EPA 2000). Die unter 6.3-5 beschriebene Vorgehensweise ist somit gerechtfertigt und soll hier noch einmal kurz zusammengefasst und diskutiert werden.

Zunächst wurde durch die exemplarische Untersuchung verschiedener binärer Mischungen aus 5-MOP und 8-MOP detailliert deren Verhalten charakterisiert und die Annahme additiven Verhaltens überprüft. Dafür wurden die Mischungen 1, 5 und 6 (vgl. Tab. 6.1) isobolographisch auf Abweichungen von der Iso-Effekt-Linie (Isobole) und somit Additivität untersucht. Sowohl im Resazurintest (6.3.2.1, beobachteter Effekt: EC_{50} -Wert) als auch im HPRT-Assay (6.4.3.1, Mutationsfrequenz von 50, 75 & $100 \cdot 10^{-6}$) und Mikrokerntest (6.5.3.1, 100, 150 & $200 \cdot 10^{-3}$ MNZ) konnten, wenn überhaupt, nur geringfügige Abweichungen von der Isobole innerhalb der Fehlertoleranzen beobachtet werden, die nicht auf mögliche synergistische oder antagonistische Wechselwirkungen schließen ließen. Auch der analoge verallgemeinerte mathematische Vergleich über den Interaktions-Index CI liefert gleiche Ergebnisse (6.3.2.2, 6.4.3.2, 6.5.3.2): Außer Mix 6 im Resazurintest und Mix 1 im Mikrokerntest unterscheidet sich keiner der CIs der Mischungen 1, 5 oder 6 innerhalb der Fehlertoleranzen signifikant von 1, auch die Abweichungen lassen keinen eindeutigen Trend beobachten. Schließlich zeigen auch die EC_{50} -Werte bzw. DRCs der über das PXEF-Konzept berechnete PXEQ mit den Werten des reinen Index-Stoffs 5-MOP sehr gute Übereinstimmungen (6.3.2.2, 6.4.3.3, 6.5.3.2). Somit ist auf strikt dosisadditives Verhalten der Mischungen aus 5-MOP und 8-MOP zu schließen, was über den Vergleich der gefundenen DRCs mit den theoretischen bestätigt werden konnte. Literaturdaten zum Verhalten von Furocumarin-Mischungen sind allerdings sehr begrenzt. Brickl et al. (1984) zeigten an Probanden bei einer sukzessiven oralen Gabe von 5-MOP und 8-MOP im Abstand von 30 min aufgrund des *in vitro* nicht zu berücksichtigenden First-Pass-Effekts eine Verstärkung der phototoxischen Wirkung im

Vergleich zu den Einzeldosen. Bei simultaner Gabe von 5-MOP und 8-MOP hingegen ist ein rein additives Verhalten der Einzelkomponenten zu verzeichnen, wobei dieses Ergebnis mit Vorsicht zu betrachten ist, da die Stärke der Hautreaktion nicht absolut quantifiziert werden kann und die zugrundeliegende FC-Konzentration im Blut aufgrund des First-Pass-Effekts erst nach Überschreiten eines Schwellenwerts stärker als additiv ansteigt. Zudem konnten dosisabhängige phototoxische Effekte in der Haut gezeigt werden, die Additivität verhielt sich jedoch dosisunabhängig (Schlatter et al. 1991). Diese Autoren schätzten weiterhin 10 mg 8-MOP + 10 mg 5-MOP als 15 mg 8-MOP-Äquivalente ab, in Analogie zu dem hier formulierten PTEF-Konzept.

Da es sich hierbei allerdings nur um binäre Mischungen handelt, deren Komponenten nicht nur strukturell und somit bezüglich Löslichkeit, Lipophilie und Interkalationsverhalten (Mary et al. 1998, Caffieri 2001) ähnlich sind, sondern auch bezüglich ihrer Photo-Toxizität, -Mutagenität und -Clastogenität, Bindungsaffinität (Isaacs et al. 1984) und Quantenausbeuten (Rodighiero et al. 1970) und *in vivo* Photosensibilisierung (Musajo and Rodighiero 1972), blieb zu überprüfen, ob die gefundene Dosis-Additivität auch für FCs mit weit unterschiedlicherem photobiologischen Potential in komplexeren Mischungen gegeben ist. Hierzu wird die Additivität zur Minimierung des Probenaufwands an einigen ausgewählten Gemischen (Tab. 6.1) über den Interaktionsindex CI und den Vergleich der PXEQ- und 5-MOP-DRCs untersucht. Bei der Zusammenstellung der Mischungen sollten folgende Gesichtspunkte berücksichtigt werden:

- Generelle Übertragbarkeit des PXEF-Konzepts auf alle Furocumarine
- Beeinflussung der biologischen Effekte potenter Furocumarine durch weniger oder unreaktive Furocumarine durch möglicherweise kompetitiven Antagonismus (Mix 2, 4, Angelika)
- Beeinflussung der strikten Additivität durch mögliche abweichende Reaktionsmechanismen wie Generierung von ROS oder erhöhte Tendenz zur Crosslink- oder Monoaddukt-Bildung (Mix 2-4, 7, 8), die bei binären 5-MOP + 8-MOP-Gemischen nicht zu erkennen waren
- Generelle Übertragbarkeit des PXEF-Konzepts auf Mischungen aus vielen Komponenten (Mix 8, Angelika)
- Übertragbarkeit des PXEF-Konzepts auf natürlich vorkommende FC-Mischungen in komplexen Mischungen wie pflanzlichen Extrakten (Angelika).

Über den Vergleich der Interaktions-Indices und der Steigungen der Regressionsgeraden bzw. EC₅₀-Werte der Mischungen mit denen des Index-Stoffs 5-MOP ist eine im Allgemeinen sehr gute Übereinstimmung zu erkennen. Etwaige Abweichungen lassen jedoch keinen eindeutigen Trend erkennen, zeigen sich doch sowohl Indizien für synergistische (HPRT-Assay, Mix 3 & 7, Resazurintest, Mix 8) als auch antagonistische (Mikrokern-Assay, Mix 2, Resazurintest, Mix 2 & Angelika) Wechselwirkungen.

Auffällig ist bei letzteren die extrem signifikante (n=3-4) Abweichung in Zusammenhang mit weniger oder nicht phototoxischen (Furo-)cumarinen, die möglicherweise nicht nur durch generell übliche Schwankungen der Ergebnisse oder Probleme beim sigmoidalen Fit der Phototoxizitätsdaten zu erklären sind. Denkbar wäre eine kompetitive Hemmung in diesem hohen Dosisbereich (bis zu 100 µg/ml Limettin bei Mix 2), wobei Limettin allerdings nur maximal alle 160 Nukleotide interkalieren kann, im Gegensatz zu 5-MOP oder 8-MOP (1:50) (Ou et al. 1978). Daher kann Limettin nur einen kleinen Teil der reaktiven Zentren für 5-MOP blockieren, weshalb so ein möglicher kompetitiver Antagonismus nur gering ausgeprägt wäre. Der EC₅₀-Wert des Angelika-Extrakts lag

weiterhin bei etwa 11,5 µg/ml Gesamt-Furocumarin-Gehalt und somit weit unter der maximal getesteten FC-Menge von Mix 3 (40 µg/ml) oder 4 (47 µg/ml), die im HPRT-Assay jedoch keine Abweichung von der Additivität zeigten.

Eine weitere Möglichkeit wäre ein unbemerktes Ausfallen der Furocumarine aus der Inkubationslösung und somit eventuell auch die Bildung von Mischkristallen aus schwächeren und potenteren FCs, das beim Arbeiten im Dunkeln unbemerkt blieb, aber die Menge der in Lösung befindlichen und somit der Zelle verfügbaren Furocumarine verringerte. Ein Wiederholen der Versuche mit geringerer FC-Konzentration und höherer UVA-Dosis unter Ausnutzung eines konstanten Proportionalitätsfaktors f könnte eventuell Aufschluss liefern, wobei zunächst die Konstanz von f in allen getesteten Bereichen überprüft werden müsste.

Generell kann jedoch auf die Übertragbarkeit der Additivität von FCs im Resazurin-Test (höherer Dosisbereich) auf den HPRT- und Mikrokern-Assay (geringere FC-Menge) geschlossen werden, was auch gezeigt wurde. Begründet kann dies dadurch werden, dass die Menge interkalierter Furocumarine im Gleichgewicht mit denen in Lösung steht und somit proportional dazu ist und die Menge möglicher Addukte unter UVA-Bestrahlung proportional zu der Menge der interkalierten FCs ist. Die Addukte wiederum befinden sich in enger Korrelation mit den biologischen Effekten wie Phototoxizität und -Mutagenität (Musajo and Rodighiero 1972).

Der Vergleich mit der Literatur scheint für diese Problemstellung jedoch wenig aufschlussreich: Zu den in dieser Arbeit durchgeführten analogen Untersuchungen, in denen sowohl die Effekte von einzelnen Furocumarinen als auch Mischungen daraus, sowohl natürliche als auch künstliche, betrachtet werden, und Untersuchungen zur Additivität sind in der Literatur kaum zu finden. Anwendungen des TEF-Konzepts sind bisher nur für wenige Pestizide (Organophosphor-Verbindungen) oder dioxinähnliche Verbindungen publiziert (Reffstrup et al. 2010). Neben den o.g. *in vivo*-Untersuchungen von Schlatter et al. (1991) zeigten Abel und Schimmer (1986) an humanen Lymphozyten antagonistische Effekte einer ebenfalls binären Mischung aus Heraclenin und Imperatorin bezüglich der Induktion von Chromosomenaberration und SCEs ohne Lichteinfluss. Sie vermuteten eine kompetitive Hemmung der Aktivität von Heraclenin durch das weniger potente Imperatorin bei einer Gesamt-Konzentration von bis zu 20 µg/ml. Derartige Vermutungen können durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da z.B. Mix 3 (10 µg/ml Imperatorin, 30 µg/ml Angelicin) oder Mix 4 (5 µg/ml Imperatorin, 15 µg/ml Angelicin, 2 µg/ml 8-MOP, 25 µg/ml Limettin) bei einer höheren Substanzmenge im HPRT-Assay keine antagonistischen Effekte zeigten. Schimmer und Kühne (1990) untersuchten die Photomutagenität in Arginin-defizienten *C. reinhardtii* durch einen ethanolschen Extrakt der Weinraute (*Ruta graveolens* L.) und den darin enthaltenen photomutagenen Komponenten, die Furocumarine 5-MOP, Psoralen, Imperatorin und Isopimpinellin, und die Furochinoline Skimmianin, γ -Fagarin und Dictamnin, die ebenfalls nach der Interkalation in die DNA unter UVA-Bestrahlung Monoaddukte bilden. Auch wenn die Daten größeren Schwankungen als die hier erzielten Ergebnisse in V79-Zellen unterliegen, sind prinzipiell bei allen Einzelsubstanzen und dem Extrakt lineare Zusammenhänge zwischen der Zahl der Arg⁺-Revertanten und der Konzentration bei einer konstanten UVA-Strahlungsdosis zu erkennen, weshalb zum Vergleich deren Daten in Analogie zu dem hier etablierten PMEF-Konzept ausgewertet wurden: 5-MOP wurde aufgrund seines größten Potentials wieder als Index-Stoff gewählt und den anderen Substanzen ihr PMEF zugeordnet, 5-MOP (1), Psoralen (0,05), Imperatorin (0,02), Isopimpinellin (0),

Skimmiannin (0,002), γ -Fagarin (0,07) und Dictamnin (0,22). Daraus wurden die PMEQ des Extrakts berechnet und die gefundene Steigung der Regressionsgeraden mit der des Index-Stoffs 5-MOP, der sie entsprechen soll, verglichen. Die Steigung der Geraden des Extrakts beträgt allerdings nur 57% der von 5-MOP, weshalb auch bei den Ergebnissen dieser Autoren auf antagonistische Effekte durch weniger photoaktive Substanzen geschlossen wird, was aber nicht den Ergebnissen meiner Arbeit entspricht. Eine mögliche Erklärung könnte auch eine eventuelle mangelnde Qualität der Extraktanalyse sein, da es sich dabei um ältere Daten handelt ohne Angabe der Reinheit der Standards oder Wiederfindungsraten (Paulini, Eilert and Schimmer 1987).

Andere Quellen zu Furocumarinmischungen befassen sich meist mit Pflanzenextrakten, bei denen bestenfalls die phototoxischste Substanz identifiziert wird, nicht aber andere Komponenten oder gar deren Verhalten in der Mischung charakterisiert werden. Awerbeck et al. und Zaynoun et al. identifizierten 5-MOP in Bergamottöl als einzige phototoxische Substanz, gezeigt durch Rückmutationen in *his*⁻-Mutanten von *S. cerevisiae* (Awerbeck et al. 1990a) und Toxizität in *C. albicans*, wobei das Absterben des Pilzes mit dem Gehalt von 5-MOP im Bergamottöl korreliert war (Zaynoun, Johnson and Frain-Bell 1977). Dieses enthielt neben 5-MOP auch Limettin und Bergamottin, die in dieser Arbeit deutlich weniger oder gar nicht photobiologisch aktiv waren. Es ist davon auszugehen, dass diese auch in dem von Awerbeck et al. verwendeten Bergamottöl enthalten waren (nicht bestimmt). Die Autoren zeigten in *S. cerevisiae* bei gleichen Konzentrationen von 5-MOP, entweder als Reinsubstanz oder als Inhaltsstoff in Bergamottöl, nach Bestrahlung mit UVA-Licht stark ähnliche Einflüsse auf die Vitalität, Vorwärts- und Rückmutationen oder Chromosomenaberrationen (Awerbeck et al. 1990a). Somit sind hier kompetitiv-antagonistische Effekte von Limettin oder Bergamottin nicht sehr wahrscheinlich, was mit den hier gezeigten Ergebnissen übereinstimmen würde.

Knudson und Kroon interpretierten lediglich qualitativ die unterschiedliche Phototoxizität verschiedener Pflanzensäfte in *C. albicans* und im Photo-patch-Test an Probanden über die Anzahl unterschiedlicher phototoxischer Furocumarine durch den Vergleich mit der Literatur, wobei auch einige, z.B. Oxypeucedanin, nicht erwähnt werden. Sie fanden die Reihenfolge Wilde Pastinake (*Pastinaca sativa*, 5-MOP, 8-MOP) > Riesen-Bärenklau (*Heracleum mantegazzianum*, 5-MOP, 8-MOP, Psoralen), Angelika (*Angelica archangelica norvegica*, 5-MOP, 8-MOP) > Petersilie (*Petroselinum sativum*, 5-MOP) > Knollensellerie (*Apium graveolens rapaceum*, 5-MOP) > Dill (*Anethum graveolens*) (Knudson and Kroon 1988). Diese Ergebnisse lassen allerdings keine quantitativen Aussagen über das Verhalten der FCs in der Mischung und somit direkten Vergleich zu den hier gefundenen Ergebnissen zu. 5-MOP, 8-MOP, Psoralen, Imperatorin und Angelicin zeigten bezüglich der lichtunabhängigen Toxizität oder Unterdrückung des Fraßverhaltens zweier Spodoptera-Arten in binären oder tertiären Mischungen sowohl additive, antagonistische oder synergistische Effekte, je nach Substanz, Mischungsverhältnis oder Konzentration (Calcagno et al. 2002, Diawara et al. 1993), und lassen so auch für lichtunabhängige Effekte keine eindeutigen Schlussfolgerungen zu.

Da in der Literatur somit keine eindeutigen Angaben zur Dosis-Additivität gefunden werden konnten, spricht nichts gegen die Annahme, dass das hier gezeigte additive Verhalten von Furocumarinen und Analogen bezüglich ihrer Phototoxizität, -mutagenität und -clastogenität in V79-Zellen durchaus korrekt ist. Dies gilt auch für die Schlussfolgerung, dass dieses Verhalten am besten als Dosis-Additivität, weniger als Effekt-Additivität beschrieben werden kann. Dennoch ist in der Realität von einem

Mischmodell auszugehen, da aufgrund der variablen Ausprägung verschiedener Wirkungen wie DNA-Addukt-, ICL-Bildung oder ROS-Generierung ein effektadditives Verhalten nicht ganz ausgeschlossen werden kann. Da es sich aber gerade im HPRT- und Mikrokern-Assay um lineare Dosis-Wirkungsbeziehungen handelt, die für Dosis- und Effektadditivität gleiche Ergebnisse liefern (Cassee et al. 1998), und lineare DRCs die Anwendung eines TEF-Konzepts erlauben (Reffstrup et al. 2010), ist gerade hier eine definitive Aufklärung zur Erstellung eines PMEF- und PCEF-Konzepts nicht zwingend vonnöten, wohl aber für andere Bereiche (vgl. 7.5 & 7.6).

Weiterhin konnte exemplarisch über die Testung des Angelika-Extrakts gezeigt werden, dass das PTEF- und PMEF-Konzept nicht nur für künstliche, sondern auch natürlich vorkommende Furocumarinmischungen anwendbar ist und gute Ergebnisse bezüglich der Additivität der PTEQ und PMEQ liefert. Zudem bestätigen diese Ergebnisse die Annahme, dass das Vorgehen bezüglich der Testung und Bewertung komplexer Mischungen (2.2.3) richtig war (Feron et al. 1995): In der komplexen Mischung (Angelika-Extrakt) wurden Furocumarine als risikoreichste Stoffe bezüglich photobiologischer Aktivität identifiziert, als einfache Mischung behandelt und deren Komponenten einzeln getestet. Daraus wurden die PTEQ und PMEQ des Extrakts berechnet und mit den gemessenen Ergebnissen des Extrakts verglichen, welche recht gut übereinstimmten.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Annahme der Dosis-Additivität in dieser Arbeit, bei gleichen, wenn auch unterschiedlich ausgeprägten Reaktionsmechanismen und ähnlichen Targets, auch weit über dem NOAEL erlaubt ist. Generell schien die Annahme der Dosis-Additivität nur bei gleichen Reaktionsmechanismen und Targets um den NOAEL der Mischung prinzipiell gerechtfertigt, bei unterschiedlichen Mechanismen und Targets sind Wechselwirkungen bereits unterhalb des NOAEL gezeigt worden (Feron et al. 1995, US-EPA 2000).

Für die „Mischung“ 5-MOP plus UVA-Strahlung konnte in allen zellbasierten Assays gezeigt werden, dass nur die Kombination, nicht jedoch die Applikation von 5-MOP oder UVA-Strahlung allein eine Systemantwort hervorruft. Es konnten für beide Komponenten eindeutig synergistische Effekte gezeigt werden wie in der Literatur beschrieben (Yurkow and Laskin 1991); eine additive Wirkung war aufgrund der unterschiedlichen und voneinander abhängigen Wirkmechanismen nie zu erwarten.

7.5 Exakte Bestimmung der Effekte und Wirkmechanismen / Ausblick

Bei strikt linearen Verläufen in einzelnen *in vitro*-Testsystemen wie HPRT- oder Mikrokerntest ist die exakte chemische Natur der Schäden, die zu den untersuchten Effekten geführt haben, und ob es sich dabei um einen Dosis- oder Effekt-Additivität handelt, nahezu irrelevant (Cassee et al. 1998, Marquardt and Schäfer 2004). Sollte jedoch der Anspruch erhoben werden, die einzelnen PXEFs zu einem kombinierten *in vitro* Äquivalenz-Faktor zusammenzuführen oder dieses Konzept auch auf andere Phototoxine wie z.B. das hauptsächlich aneugen über einen ROS-vermittelten Mechanismus wirkende Hypericin (Roelants et al. 2009, Vantieghem et al. 2002) oder diese Ergebnisse auf die *in vivo* Situation am Menschen zu übertragen, wo andere Mechanismen als nur die reine Adduktbildung an die DNA berücksichtigt werden müssen (vgl. 7.6), ist die Kenntnis über die Art der Schäden und zugrundeliegende Wirkmechanismen essentiell. So ist z.B. die

Erstellung eines einzigen TEF-Wertes pro Substanz über alle Endpunkte gemittelt nur möglich bei gleichen Wirkmechanismen und Anwendbarkeit auf alle Endpunkte, Konzentrationen und Expositionsauern (Reffstrup et al. 2010). Wie schon im Verlauf dieser Arbeit gezeigt wurde, scheint bei einigen Furocumarinen wie Oxypeucedanin ein erhöhtes Potential zur Crosslinkbildung stärkere clastogene als mutagene Effekte zu verursachen (7.2.1.1), während andere wie Angelicin als Monoadduktbildner hauptsächlich mutagen wirken, wobei gerade hier der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies zu klären ist. So können durch ROS modifizierte promutagene DNA-Basen wie 8-Oxo-dG oder FaPy (Liu et al. 1999, Orimo et al. 2006, Wang 2008) ebenfalls zur Erhöhung der Mutagenität beitragen, auch wenn z.B. bei 5-MOP dieser Beitrag eher gering ist (Pathak and Joshi 1984). Für stärkere ROS-Photoproduzenten wie Angelicin scheint allerdings eine gewisse Relevanz gegeben zu sein: So zeigten Viola et al. (2009) mittels Durchflusszytometrie bei 8-MOP und Angelicin in humanen Keratinozyten nach UVA-Bestrahlung eine identische Population in dem der Apoptose zugeordneten Arrest in der sub-G₁ Phase nach 48 h und 72 h. Dies lässt was auf eine späte bzw. programmierte Apoptose durch DNA-Schäden schließen, die sowohl durch FC-DNA-Addukte als auch ROS entstanden sein könnte (Godar 1999). Die Anteile der Zellpopulationen in der sub-G₁-Phase nach 24 h jedoch waren unterschiedlich, 6,1 % bei 8-MOP und 9,9 % bei Angelicin (Viola et al. 2009), wodurch zu vermuten ist, dass es sich hierbei auch um vorprogrammierte Apoptosen, wie sie durch ¹O₂ früh oder O₂^{•-} und z.B. Crosslinking des FasR mittelfrüh induziert werden (Godar 1999). Dafür spricht auch das bereits nach 24 h zellzyklusunabhängige Auftreten von Apoptosen in HL-60-Zellen durch Angelicin und TMA gegenüber 5-MOP und 8-MOP, die erst nach einem Arrest in der G₂/M-Phase und nach 48 h Apoptosen induzierten (Viola et al. 2004).

Inwiefern das unterschiedliche Potential verschiedener Furocumarine, generell Monoaddukte zu bilden und diese in Crosslinks umzuwandeln, tatsächlich für die in dieser Arbeit beobachteten Reaktivitätsunterschiede und Unterschiede im toxischen / mutagenen / clastogenen Potential verantwortlich ist (Babudri et al. 1981, Liu-Lee et al. 1984b, Musajo and Rodighiero 1972), bleibt ebenfalls abschließend zu klären: In einem ersten Schritt sollte generell die DNA-Photobindungs-Kapazität der einzelnen Furocumarine bestimmt werden, z.B. über die Bestimmung radioaktiv markierter FCs pro Nucleotid bei vergleichbaren Konzentrationen und UVA-Dosen (Averbeck 1985, Isaacs et al. 1984).

Das Verhältnis Monoaddukt / Interstrand-Crosslink kann anschließend beispielsweise über das Messen der Schmelztemperatur (thermischer Denaturierungs- und Renaturierungs-Assay, D-R) der aus Zellen isolierten DNA und/oder Poly(dA-dT)- Poly(dA-dT)-DNA bestimmt werden. Letztere hat den Vorteil, dass an diese nicht nur FCs bevorzugt binden, sondern sie nur zwei statt drei Wasserstoffbrückenbindungen aufweist und somit früher als GC-reiche DNA schmilzt, was schonender ist. Je höher die Schmelztemperatur, desto mehr Monoaddukte werden in ICLs umgewandelt (Bissonnette, Arnason and Smith 2008, Bode 2004, Wulff et al. 1998). Bissonnette et al. (2008) setzten dafür eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) Methode ein, die einfacher und schneller durchzuführen ist und ebenfalls analog zu den hier gezogenen Schlussfolgerungen 5-MOP, 8-MOP und Psoralen, nicht aber Angelicin als Crosslinker identifiziert. Ebenso kann das MA/ICL-Verhältnis über alkalische Filterelution (AFE) bestimmt werden: Durch die Quervernetzung der DNA ist das Denaturieren der DNA unvollständig, die DNA-Stücke werden so im Vergleich zu nicht quervernetzter DNA größer und verbleiben länger im Filter. Weiterhin sind Crosslinks stark, Monoaddukte eher schwach in der Lage, die

Elongation bei der DNA-Synthese durch die *E.coli* DNA-Polymerase I abubrechen (Piette and Hearst 1983), wohingegen bei der RNA-Polymerase kein Unterschied feststellbar ist, weshalb eine Analyse der abgebrochenen Transkripte ebenfalls Aufschluss über die Art der Addukte geben kann (Gniazdowski and Cera 1996).

Auch ein modifizierter Comet-Assay, bei dem wie bei Wu et al. (2009) nach der 8-MOP + UVA-Behandlung von HaCaT-Zellen randomisiert DNA-Strangbrüche mittels γ -Strahlung induziert wurden, eignet sich generell zur Detektion von ICLs, da aufgrund der Crosslinks die durch die nachträglich induzierten Strangbrüche erhöhte Tail Intensity im Vergleich zur Negativkontrolle verringert wird. Über den Comet-Assay können auch zusätzlich oxidative Basenmodifikationen über Zugabe von bestimmter Reparaturenzyme, die spezifisch DNA-Schäden erkennen, diese ausschneiden und so über die Erhöhung der Tail Intensity detektierbare Strangbrüche hinterlassen, wie beispielsweise die Formamidopyrimidin-(FaPy)-Glykosylase (FPG) aus *E.coli*, die unter anderem FaPy oder 8-oxo-dG erkennt (Boiteux et al. 1992). Mit Hilfe des Comet Assays könnten auch Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob es sich bei den der Mikrokernbildung zugrunde liegenden DNA-Strangbrüchen um aufgrund der FC-Adduktbildung S-Phase-abhängige Strangbrüche handelt oder ob sie direkt durch ROS induziert wurden (Brendler-Schwaab et al. 2004, Klotz et al. 2003).

Schließlich stellten Cao et al. und Lai et al. eine HPLC-Tandem-massenspektrometrische Methode vor, die nicht nur die Detektion von 8-MOP-DNA-ICLs in humanen WM-266-4 Melanomzelllinien ermöglicht (Cao et al. 2008, Lai et al. 2008), sondern auch die Identifikation parallel entstehender bzw. vorausgehender Monoaddukte (Lai et al. 2008, Schmitt et al. 1994). Dies ist nicht nur für die Bestimmung des MA/ICL-Verhältnisses, sondern auch für die Abschätzung der Entstehung weiterer ICLs nach erneuter UVA-Bestrahlung relevant, da nur die Furan-side Monoaddukte durch weitere Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 365 nm in ICLs umgewandelt werden können (Scott et al. 1976).

7.6 Relevanz des PXEF-Konzepts *in vivo* / Ausblick

Generell kann angenommen werden, dass die Basiselemente der DNA-Struktur und Reparatur in V79-Zellen ähnlich, wenn auch nicht identisch, zu humanen Zellen sind, auch in der Haut. Die Übertragbarkeit der Resultate in Prokaryonten, z.B. aus dem Ames-Test, ist von geringerer Relevanz. So kann angenommen werden, dass eine in V79-Zellen mutagene Substanz wie Furocumarine + UVA-Licht auch in der Haut, sollte eine ausreichende Menge diese erreichen, mutagen wirkt und somit das hier gewählte Modell für mechanistische Studien im Zielorgan Haut und der dort gefundenen FC-Konzentrationen, zunächst ohne Berücksichtigung von Aufnahme und Metabolismus, geeignet ist (Bradley et al. 1981).

Über eine Studie am Meerschweinchen konnte eine gute Korrelation zwischen der 8-MOP- und 5-MOP-Konzentration im Blutserum und der Epidermis von etwa 3:2 gezeigt werden (Kornhauser, Wamer and Giles 1982). Typische Serum-Konzentrationen, die phototoxische Reaktionen wie Erytheme hervorrufen, sind etwa 10-20 ng/ml + 10-20 J/cm² UVA, wobei auch ein Threshold-Dose von etwa 10-15 ng/ml (Intraspezies-Varianz) zunächst überschritten werden muss (Schlatter et al. 1991). In der PUVA-Therapie, in deren Zusammenhang auch eine erhöhte Hautkrebsinzidenz beobachtet wurde, können die

FC-Konzentration zwischen 50-250 ng/ml, 2 h nach der oralen Gabe, variieren (de Wolff and Thomas 1986). 30 min nach der oralen Gabe können bei 0,6 mg/kg KG bzw. 40 mg pro Person etwa 80 ng/ml (Shephard, Langguth and Panizzon 2001), aber auch bis zu 550 ng/ml erreicht werden (Brickl, Schmid and Koss 1984, Schlatter et al. 1991). Diese Substanzkonzentrationen liegen zwar gut zwei Größenordnungen unter den in dieser Arbeit getesteten, was weiterhin einen möglichen kompetitiven Antagonismus ausschließen lässt, allerdings sind auch die dort applizierten UVA-Dosen etwa 100-fach höher. Im HPRT- und Mikrokern-Assay konnte in dieser Arbeit an V79-Zellen jedoch gezeigt werden, dass der Proportionalitätsfaktor f in der Funktion Mutationsfrequenz bzw. Mikrokerninduktion als Produkt von f , der 5-MOP-Konzentration und der UVA-Dosis über den getesteten UVA-Bereich von 50-200 mJ/cm² konstant blieb. Eine ähnliche Konstanz wurde von Kersten et al. im Mikrokerntest über einen Bereich von 100 – 400 mJ/cm² gezeigt (Kersten et al. 2002, Kersten et al. 1999). Ob sich jedoch diese Konstanz wirklich über zwei Größenordnungen erstreckt oder ob irgendwann alle Furocumarine photochemisch gebunden sind, bleibt zu überprüfen, da gezeigt werden konnte, dass die FC-Konzentration und UVA-Dosis synergistisch wirken. Dies würde am Beispiel des HPRT-Assays in einem Abflachen der Regressionsgeraden der Mutationsfrequenz als Funktion der UVA-Dosis bei konstanter FC-Konzentration resultieren. Cao et al. (2008) bzw. Gruenert et al. (1985) zeigten jedoch einen linearen Zusammenhang zwischen der DNA-Crosslink-Bildung und der UVA-Dosis bis mindestens 5 bzw. 4,5 J/cm² bei konstanter 8-MOP-Konzentration von 0,5 µg/ml in humanen Melanomzellen bzw. Fibroblasten. Die DNA-Adduktbildung generell war bis mindestens 3 bzw. 2,4 J/cm² bei 10 µg/ml bzw. 10 µM in verschiedenen humanen Fibroblasten konstant (Gruenert et al. 1985, Nocentini 1986). Diese Konzentrationen und UVA-Dosen entsprechen deutlich eher der *in vivo*-Situation. Da zudem ein enger Zusammenhang zwischen der Photoreaktivität von Furocumarinen mit der DNA und der Induktion phototoxischer Effekte in der Haut besteht (Rodighiero et al. 1970, Rodighiero et al. 1969, Marrot and Meunier 2008), sollten die in dieser Arbeit gewonnenen *in vitro*-Ergebnisse und das PXEF-Konzept durchaus indikativ für die Bewertung des Risikos adverser Hautreaktionen in Zusammenhang mit der FC-Konzentration im Serum oder der Haut anwendbar sein. Schließlich können z.B. über den HPRT-Assay nicht reparierte DNA-Basenmodifikationen aufgrund der Monoaddukt- oder ICL-Bildung als Mutationen oder indirekt aus den Addukten resultierende Strangbrüche im Mikrokernassay quantitativ bestimmt werden. Andere Autoren beschreiben auch einen engen Zusammenhang zwischen phototoxischen Hautreaktionen und der Fähigkeit zur Generierung von Singulett-Sauerstoff oder Superoxidradikalanionen (Bordin et al. 1991, de Mol et al. 1981, Joshi 1985, Joshi and Pathak 1983, Pathak and Joshi 1984). Da ¹O₂ allerdings ebenfalls über Basenmodifikationen Mutationen, DNA-Strangbrüche oder generell toxische Zellschäden erzeugen kann (Epe 1991), die wiederum in den hier verwendeten Assays erfasst wurden, ist es recht wahrscheinlich, dass über das hier präsentierte PXEF-Konzept indikativ toxische und mutagene Effekte, und somit auch die Stärke der Erytheme und womöglich auch die Erhöhung des kanzerogenen Risikos, wenn auch unter Vorbehalt, über z.B. die FC-Konzentration im Blut oder der Haut abgeschätzt werden können. Generell existiert eine recht gute Übereinstimmung zwischen den *in vitro* an Säugerzellen beobachteten Trends der Photomutagenität verschiedener Furocumarine mit der *in vivo* beobachteten Photokanzerogenität (Loveday 1996, Müller and Kasper 1998, Müller et al. 1998).

Dennoch ist die Anwendbarkeit des hier präsentierten Modells begrenzt, da nicht direkt von der Menge der oral über die Nahrung aufgenommene oder dermal applizierte Furocumarinmenge auf das Risiko der Photosensibilisierung geschlossen werden kann; folgende Punkte müssen bei der Extrapolation der Ergebnisse auf den Mensch in Betracht gezogen werden (Schoonderwoerd et al. 1991):

-Absorption:

Wie bereits unter 2.5.3.2 beschrieben, ist die dermale Resorption von Furocumarinen diffusionskontrolliert (etwaige Transportmechanismen sind nicht bekannt) und reziprok abhängig von ihrer Lipophilie (Said et al. 1997) und ihrer Trägersubstanz, z.B. Wollwachssalbe. Kammerau et al. (1976) zeigten so (1% 8-MOP in Wollwachssalbe) eine reziprok eindringtiefenabhängige FC-Konzentration in der Haut, absteigend von 10^{-2} - 10^{-3} molar (Hornhaut) über $4-6 \cdot 10^{-5}$ molar (Epidermis) bis 10^{-5} molar (Dermis). Diese stellte sich rasch (10 min) ein und blieb über einen Zeitraum von 16 h konstant. Auch wenn bei der dermalen Resorption einige Variablen berücksichtigt werden müssen, gestaltet sich die Abschätzung der FC-Konzentration im Zielgewebe über die orale Aufnahme ungleich schwieriger: Als Reinsubstanz werden Furocumarine nahezu vollständig resorbiert, z.B. 40 mg 8-MOP zu 60-80%, wobei schon die Kristallgröße oder galenische Formulierung (kristallin / in Lösung) die Resorption beeinflusst (Schmid et al. 1980, de Wolff and Thomas 1986). Die Gabe der Reinsubstanz mit der Nahrung kann zu einer deutlichen Verringerung der Resorption führen (Brickl et al. 1984, Bech-Thomsen, Angelo and Knudsen 1992), sind die FCs selbst Bestandteile der Nahrungsmittelmatrix, können bisweilen gar keine Furocumarine im Serum nachgewiesen werden. Schlatter et al. (1991) zeigten nach der Gabe von 300 g Sellerie mit einem Gesamt-FC-Gehalt von ca. 8,5 mg keine messbaren FCs im Serum, wohingegen die gleiche Menge als Reinsubstanz messbar war. Bei entsprechend höheren FC-Mengen ist dies dennoch möglich, was z.B. eine Fallstudie einer 65-jährigen Frau zeigt, die nach dem Verzehr von ca. 450 g Sellerie (entsprechend ca. 45 mg 5-MOP und 8-MOP) und anschließendem Solariumbesuch eine starke phototoxische Reaktion zeigte (Ljunggren 1990).

Nach der Absorption über die Darmwand gelangen die Furocumarine über das Pfortaderblut in die Leber; hierzu muss ein weiterer Punkt beachtet werden:

-Metabolismus:

V79-Zellen exprimieren unter normalen Kulturbedingungen keine Cytochrom-P450-Enzyme (Glatt 1993), im Gegensatz zu den Hepatozyten der Leber (Efferth 2006). In der Leber werden Furocumarine auch erst über CYP-abhängige Monooxygenasen metabolisiert und es kommt ein starker First-Pass-Effekt zum Tragen (Brickl et al. 1984). Andere Autoren vermuten auch eine bereits im Dünndarm stattfindende Metabolisierung über CYP3A4 (Guo and Yamazoe 2004). Erst wenn die metabolische Kapazität der Leber überschritten ist, können unmetabolisierte und somit noch aktive Furocumarine über den Blutkreislauf in das Zielorgan Haut gelangen (Brickl et al. 1984). Das Erreichen der sog. „Breakthrough-Dose“ ist erstens abhängig von der Menge der gleichzeitig resorbierten FCs; dies erklärt auch, wieso die systemische Verfügbarkeit von FCs in Kombination mit Nahrung geringer ist: nicht alle FC erreichen gleichzeitig die Darmwand, es werden weniger simultan resorbiert und die Schwellendosis nicht erreicht (Brickl et al. 1984). Zweitens sind Furocumarine selbst teilweise sehr starke Inhibitoren fremdstoffmetabolisierender Enzyme. Die Hemmung erfolgt kompetitiv oder meist über

irreversible Bindung des FC an das Enzym (vgl. 2.5.3.3) (Cai et al. 1996, Guo et al. 2000, Koenigs and Trager 1998). So sind z.B. die im Grapefruitsaft vorkommenden DHB, Epoxybergamottin, Bergamottin (selbst kaum phototoxisch) und die Dimere Paradisin A, B & C starke Inhibitoren von CYP1A (Baumgart et al. 2005, Cai et al. 1996) oder CYP3A4 (Guo et al. 2000, Guo and Yamazoe 2004, Paine, Criss and Watkins 2005, Tassaneeyakul et al. 2000). 8-MOP oder Isopimpinellin zeigten im Vergleich zu Angelicin oder Bergamottin etwas schwächere, aber durchaus vorhandene inhibitorische Effekte (Baumgart et al. 2005). Somit könnte eine gleichzeitige oder kurz nacheinander folgende orale Aufnahme starker CYP-Inhibitoren wie DHB oder Paradisin A durch die Verringerung der metabolischen Kapazität der Leber eine Erhöhung der systemischen Verfügbarkeit anderer, möglicherweise deutlich phototoxischerer Furocumarine nach sich ziehen, was eine höhere Phototoxizität in der Haut zur Folge hätte. Bei einer simultanen Gabe von 5-MOP und 8-MOP zeigten sich additive Effekte bezüglich der Erythembildung (Schlatter et al. 1991), womöglich aufgrund ähnlicher inhibitorischer Effekte z.B. auf CYP1A (Mays et al. 1987, Bendriss et al. 1996), was durch ähnliche 5-MOP- und 8-MOP-Konzentrationen im Serum bestätigt werden würde. Auch aufgrund der schwierig zu quantifizierenden Endpunkte sind Abweichungen von der Additivität schlecht nachzuweisen (Schlatter et al. 1991). Bei einer Gabe von 20 mg 5-MOP alleine und 30 min nach einer erneuten Gabe von 8-MOP zeigte sich bei letzteren eine deutliche Erhöhung des Plasma-Levels im Vergleich zur Einzel-Gabe, was einen sättigungsfähigen First-Pass-Effekt und die daraus resultierende höhere systemische Verfügbarkeit bestätigt (Brickl et al. 1984).

-Verteilung und Exkretion:

Sind die Furocumarine erst in den Körperkreislauf gelangt, besteht eine gute Korrelation zwischen FC-Serum-Level und Gehalt im Zielorgan (Kornhauser et al. 1982, Kornhauser, Wamer and Giles 1984); die Verteilung in der Zelle selbst wurde bereits *in vitro* berücksichtigt. Im Gegensatz zum konstanten FC-Gehalt in der Zelle *in vitro* nach Einstellen des Gleichgewichts zwischen FCs in Lösung und von der Zelle aufgenommenen unterliegt der Gehalt *in vivo* einer zeitabhängigen Exkretion (vgl. 2.5.3.2). Eine Gabe von z.B. 40 mg 8-MOP erreichte im Menschen nach 30 min einen maximalen Plasma-Spiegel von 550 ng/ml, welcher dann nichtlinear auf ca. 60 ng/ml nach 4 h abfiel (Brickl et al. 1984), weshalb der Zeitpunkt der UVA-Einwirkung nach der oralen FC-Gabe von entscheidender Bedeutung ist.

-Lichtabsorption durch endogene Substanzen / Hauttyp:

Die Photoreaktivität von Furocumarinen in der Haut kann durch endogene Chromophore herabgesetzt werden, da die applizierte UVA-Dosis durch anderweitige Absorption nicht mehr vollständig den FCs zur Reaktion zur Verfügung steht. Zunächst sind die in V79-Zellen ebenfalls vorkommenden Chromophore wie DNA oder Aminosäuren, z.B. Tryptophan, relevant (Young 1997), da die Zellen der Haut nicht als Monolayer angeordnet sind und so den unteren Schichten wie der Dermis weniger UVA-Licht zur Verfügung steht. Durch die Hornhaut (*Stratum corneum*) gelangt z.B. generell keine UV-Strahlung unterhalb von 290 nm bis in die Epidermis, wo die relevanten Reaktionen stattfinden (Scott et al. 1976). Zudem enthält das *Stratum corneum* etwa 10-fach höhere Mengen an Urocaninsäure als andere Körperstellen (Young 1997). Weiterhin befinden sich in der Haut durch Melanozyten gebildete Melanine, wobei deren photoprotektiven

Eigenschaften zwar oft genannt werden, aber generell kaum belegt und eher begrenzt sind; vielmehr ist die Bildung von Erythemen eher hauttypabhängig (Hönigsmann 2002), was die Gleichverteilung der UV-induzierten DNA-Schäden in den Hauttypen I – IV zeigt (Young 1997). Nach der Induktion einer UV-induzierten Bräunung zeigte sich in Individuen des Hauttyps III und IV eine signifikante Verringerung der UDS nach erneuter UV-Bestrahlung. Nach einer durch 5-MOP + UVA induzierten Bräunung war dies bei allen Hauttypen zu verzeichnen (Young et al. 1991), was dennoch auf einen Bräunungskorrelierten Schutz vor UV-induzierten DNA-Schäden schließen lässt.

-Reparatur:

In vivo sind die FC-Konzentrationen in den Zielzellen deutlich geringer als die hier in den *in vitro*-Tests eingesetzten, womit auch die Zahl der möglichen DNA-Addukte deutlich geringer ist. Ausgehend davon, dass komplexe Vorgänge wie die Erythembildung eng mit der Zahl der DNA-Addukte korreliert (Rodighiero et al. 1970), wobei hier noch andere Vorgänge berücksichtigt werden müssen (s.u.), und für die Erythembildung eine Schwellendosis von ca. 10-15 ng/ml 5-MOP und 8-MOP bei einer UVA-Dosis von 9 J/cm² gefunden werden konnte (Schlatter et al. 1991), könnte die nicht vorhandene Erythembildung unterhalb dieser Dosis auch auf Reparaturmechanismen der DNA oder generell in der Zelle zurückzuführen sein. Da Reparaturmechanismen allerdings auch in V79-Zellen zu finden sind und nicht vergleichend quantifiziert werden konnten, muss dieser Unsicherheitsfaktor offen bleiben. Allerdings sollten Reparaturmechanismen bei Überschreiten der nötigen Schwellendosen als nicht mehr sehr relevant angesehen werden, da auch die beobachteten, additiven Effekte in den hier verwendeten zellbasierten Assays auf überlastete Reparaturmechanismen zurückzuführen sind.

-Komplexere Reaktionen des Gewebes *in vivo*:

Das hier *in vitro* an V79-Zellen präsentierte PXEF-Konzept stellt ein gutes Instrument zur Risikobewertung komplexer Furocumarin-Mischungen dar und beschreibt recht gut die aufgrund des FC-Plasma-Levels z.B. zu erwartende Photomutagenität. Seine Einsatzfähigkeit für komplexe Organe wie die Haut ist jedoch recht begrenzt, da komplexere Vorgänge im Gewebe wie Erytheme, Kanzerogenese oder Immunreaktionen *in vitro* nicht nachgeahmt werden können, bei der Übertragung dieses Konzepts auf den Menschen allerdings beachtet werden müssen (Müller et al. 1998).

Erytheme sind entzündliche Gewebsreaktionen, in die nicht nur ein einziger Zelltyp wie Keratinozyten oder Melanozyten, sondern auch dilatierte Gefäße, verschiedene Leukozyten oder generell Botenstoffe (Zytokine) involviert sind (Hönigsmann 2002). Neben der DNA-Adduktbildung werden zunehmend immunologische Ereignisse als Ursache diskutiert; so zeigten PUVA-Patienten eine Abnahme der Immunreaktion und Veränderungen der Immunfunktionen (Kornhauser et al. 1984). Die Addukte von Furocumarinen an Biomoleküle können als Antigene wirken und allergische Reaktionen verursachen (Schoonderwoerd et al. 1991, Bonamonte et al. 2010), was bei der extrakorporalen Photopherese ausgenutzt wird (van Iperen and Beijersbergen van Henegouwen 1997) und worin auch Singulett-Sauerstoff involviert sein kann (Morita et al. 1997).

Auch bei der komplexen Kanzerogenese sind mehr Faktoren zu berücksichtigen als nur die einfache, möglicherweise initiativ wirkende FC-Adduktbildung (vgl. 2.4.2.4). Auch die Protein-Addukt-Bildung, z.B. an Enzyme, die an der Reparatur beteiligt sind (Schoonderwoerd et al. 1991), bleibt zu berücksichtigen, genau wie die im z.B. HPRT-

Assay im Gegensatz zu Mutationen (de Mol et al. 1981) nicht detektierten adversen Effekte durch ROS. Ein Zusammenhang existiert nicht nur zwischen der Erythembildung und der Fähigkeit zur Generierung von $^1\text{O}_2$ (Bordin et al. 1991), sondern auch zwischen den kanzerogenen Eigenschaften und ROS-Bildung durch FCs (Joshi and Pathak 1983, Pathak and Joshi 1984). Hierbei ist zudem nicht nur die Generierung von ROS der freien oder komplexierten FCs zu berücksichtigen, sondern auch die der bereits kovalent gebundenen Moleküle (Blan and Grossweiner 1987, de Mol et al. 1981); hier können die weiterhin gebildeten ROS z.B. mit benachbarten Guanin-Basen reagieren (Sage et al. 1989) und weitere, möglicherweise nicht reparierbare Schäden setzen. Dies käme z.B. zum Tragen, sollten die *in vivo* eher gering konzentrierten Furocumarine bei einer hohen UVA-Dosis größtenteils kovalent gebunden sein und somit alleine durch die Adduktbildung nicht mehr zur weiteren Schädigung der DNA oder anderer Biomoleküle in der Lage sein, was in den hier durchgeführten *in vitro*-Versuchen nicht relevant war. Weitere zu beachtende Punkte der Kanzerogenese *in vivo* durch Furocumarine + UVA-Strahlung sind rein durch UV-Strahlung induzierte DNA-Schäden / Mutationen, die wie von Seidl oder Wolf gezeigt in ca. 50-70% der PUVA-assoziierten Karzinome zu finden sind (vgl. 2.5.7) (Seidl et al. 2001, Wolf et al. 2004) und welche hier *in vitro* durch den Vergleich der bestrahlten und unbestrahlten Proben nicht nachgewiesen werden konnten. Dies könnte zudem als Hinweis darauf ausgefasst werden, dass ein Proportionalitätsfaktor f in einer Gleichung eines zu betrachtenden Effekts, z.B. Induktion von Mutationen, als Funktion von FC-Konzentration und UVA-Dosis nicht über einen beliebig großen Dosisbereich konstant bleibt, sondern sich *in vivo* durchaus Abweichungen von der *in vitro* beobachteten Konstanz ergeben. Weiterhin zu beachten sind mögliche Schädigungen durch Furocumarin-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze bzw. die, die noch nicht zur Ausbildung eines Erythems führen. Zwar ist allgemein die Meinung vorherrschend, dass das zusätzliche Hautkrebsrisiko durch FC-Konzentrationen unterhalb eines Schwellenwerts, der noch nicht zur Ausbildung phototoxischer Reaktionen der Haut führt, vernachlässigbar ist (SKLM 2006, SKLM 2010). Andere Autoren stellten jedoch die Hypothese auf, dass dies zwar auf nicht-Melanom-artige Hautkrebsarten zutrifft, allerdings könnten auch über die Nahrung aufgenommene FC-Mengen unterhalb der phototoxischen Schwellendosis zu einem zusätzlichen Melanom-Risiko führen. Dieses Zusatzrisiko führten sie auf den koinzidierten Anstieg des Verzehrs von Zitrusprodukten und dem Auftreten von Melanomen um das jeweils Fünffache zwischen 1961 und 2003 zurück (Sayre and Dowdy 2008). Dieser Zusammenhang ist zwar nur eine Hypothese, allerdings kann ein einziger, nicht reparierter DNA-Schaden durchaus zur Initiation einer Zelle führen. Generell kann jedoch nicht absolut die Photomutagenität *in vitro* auf die Kanzerogenität im Menschen übertragen werden; verlässlichere Rückschlüsse lassen nur z.B. die Daten aus Follow-up-Studien aus der PUVA-Therapie zu (Müller and Kasper 1998)

-Ausblick:

Gegenüber dem Ansatz, Furocumarine als „eine Substanz“ wie z.B. das aus der PUVA-Therapie bekannte und gut erforschte 8-MOP anzusehen und zu bewerten, hat das in dieser Arbeit präsentierte PXEF-Konzept ein deutlich höheres Potential, die adversen Effekte einer FC-Mischung realitätsnäher darzustellen. Somit stellt dieses Konzept die nächst exaktere Stufe in der FC-Risikobewertung dar und erlaubt eine verfeinerte Bewertung (Bradbury, Feijtel and Van Leeuwen 2004). Daher kann, sofern es die Datenlage erlaubt,

statt der Gesamt-FC-Exposition einer Population oder eines Individuums über die durchschnittliche Verzehrmenge aller FC-haltigen Lebensmittel oder dermale Exposition ebenfalls die Aufnahmemenge jedes einzelnen Derivats abgeschätzt werden und die Gesamtmenge als Dosisäquivalent angegeben werden nach

$$PXEQ_{gesamt} = \sum_i M_i \times PXEQ_i, \text{ dabei } PXEQ = \sum_j PXEF_j \times FC_j$$

Mit: $PXEQ$ = Photo-,Toxizitäts“-Äquivalenzmenge, berechnet aus allen gefundenen FCs multipliziert mit dem jeweiligen Äquivalenzfaktor $PXEF$

$PXEQ_{gesamt}$ = aufgenommene Gesamt-Photo-,Toxizitäts“-Äquivalenzmenge

$PXEQ_i$ = Photo-,Toxizitäts“-Äquivalenzmenge in jedem FC-haltigen Lebensmittel i

M_i = aufgenommene Menge des FC-haltigen Lebensmittels i

Das in dieser Gleichung in $PXEQ$ verwendete X könnte dabei nicht nur für Toxizitäts-Mutagenitäts- und Clastogenitäts-Äquivalente stehen, die in dieser Arbeit bestimmt wurden, sondern könnte durchaus auch in einer nächst exakteren Stufe als ein kombinierter Faktor angelegt sein, der Daten aus *in vivo*-Untersuchungen beinhaltet, wie *in vivo* Phototoxizität oder Kanzerogenität. Aufgrund des dafür benötigten sehr hohen Tierbedarfs könnten zumindest statt der *in vivo* Phototoxizität alternativ auch Daten z.B. aus *in vitro* rekonstruierten Hautmodellen herangezogen werden, bei denen die Vitalität und Bestimmung verschiedener Entzündungsmediatoren als Maß für die Phototoxizität dienen (Lelièvre et al. 2007).

Das nächst realistischere Modell, in das die in dieser Arbeit gezeigten Abstufungen in der phototoxischen Potenz ebenfalls integriert werden könnten, stellt die computergestützte physiologisch-basierte pharmakokinetische Modellierung (pbpk modeling) dar (Price et al. 2003). Hierbei könnten nicht nur individuelle Verzehrsgewohnheiten und interindividuelle Unterschiede wie Hauttyp, Körpergewicht oder Durchblutung des Menschen berücksichtigt werden, um die FC-Konzentration im Zielorgan Haut abzuschätzen. Neben dem unterschiedlichen phototoxischen und mutagenen Potential und der Fähigkeit zur Generierung von ROS, die in guter Korrelation zu dem photokanzerogenen Potential der FC stehen (Joshi and Pathak 1983, Musajo and Rodighiero 1972, Rodighiero et al. 1970), sollten weiterhin die unterschiedlich ausgeprägte Inhibierung Fremdstoff-metabolisierender Enzyme und der zeitliche Verlauf der FC-Aufnahme berücksichtigt werden. Hierzu könnte analog zur phototoxischen Potenz die inhibitorische Kapazität der einzelnen FCs bezüglich aller an der FC-Metabolisierung beteiligten Enzyme bestimmt werden. Zudem ist die Bioverfügbarkeit von FCs stark zeitabhängig (s.o.), was ebenfalls im pbpk-modeling berücksichtigt werden müsste. Um eine möglichst umfassende Berücksichtigung aller natürlich vorkommenden FCs zu ermöglichen, könnten die Eigenschaften aller noch nicht getesteten Furocumarine weiterhin über QSAR-modeling näherungsweise bestimmt werden (Kubinyi 1997).

Auch wenn vermutlich bei einer durchschnittlichen Furocumarin-Verzehrsmenge von 0,56 mg pro Person und Tag nicht von einem erhöhten Risiko phototoxischer Hautreaktionen oder einem erhöhten Hautkrebsrisiko auszugehen ist (SKLM 2006, SKLM 2010), existieren dennoch bestimmte Risikogruppen wie Kleinkinder, Feldarbeiter oder Vielverzehrer von FC-haltigen Lebensmitteln, bei denen es auch zu Akutexpositionen über der phototoxischen Schwelldosis von z.B. 15 mg 8-MOP (Schlatter et al. 1991) kommen kann. Auch durch die seit den 1970er Jahren immer populärer werdende „Biowelle“ und

den damit verbundenen Einsatz von Stalldung und Verzicht von Fungiziden könnte es möglicherweise zu einem erhöhten mikrobiellen Befall der Lebensmittel und somit einem Anstieg der FC-Gehalte kommen (Winter and Davis 2006), wodurch es zu relevanten Expositionen kommen könnte. In diesem Fall sind Risikominimierungs-Maßnahmen zu treffen, die zur Verringerung des FC-Gehalts in Lebensmitteln führen. Dazu gehören korrekter Anbau und Lagerung FC-haltiger Früchte und Gemüse (Ostertag et al. 2002) oder die Verwendung destillativ gewonnener Zitrusöle zur Aromatisierung (SKLM 2006); auch die Entfernung / Zerstörung von Furocumarinen, z.B. in Grapefruitsaft, durch UVA-Bestrahlung (Uesawa and Mohri 2006b), Kochen (Uesawa and Mohri 2006a) oder den Einsatz von Pilzen (Myung et al. 2008) ist möglich. Generell ist jedoch bei einer FC-Akutexposition die Vermeidung von UVA-Strahlung als Alternative zu nennen.

8 Zusammenfassung

Furocumarine (FC) sind eine Gruppe von sekundären Pflanzenmetaboliten, die u.a. von Früchten und Gemüse wie Grapefruit oder Sellerie als Phytoalexine gebildet werden. Die geschätzte durchschnittliche menschliche Exposition liegt so bei einer Gesamt-FC-Menge von 0,56 mg/Tag in Deutschland, bei Akutexpositionen können 100-fach höhere Werte erreicht werden. Chemisch betrachtet besteht ihre Struktur aus einem Cumarinmolekül mit linear oder angular ankondensiertem Furanring und sie können zudem unterschiedlich substituiert sein. Neben synthetisch hergestellten sind über 90 verschiedene natürlich vorkommende Derivate bekannt, die sich in der Ausprägung ihrer Eigenschaften stark unterscheiden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit den *in vitro* in V79-Zellen photochemisch durch UVA-Strahlung ($\lambda_{\max} \approx 365$ nm) induzierten Eigenschaften Phototoxizität, Photomutagenität und Photoclastogenität. Zur Quantifizierung dieser Eigenschaften wurden diverse Testsysteme wie Resazurin-Reduktionstest, HPRT-Assay oder Mikrokerntest speziell für photochemische Anwendungen etabliert und optimiert:

Zur Quantifizierung der Phototoxizität konnte am Beispiel von 5-MOP der Resazurin-Reduktionstest als am zuverlässigsten und zeit- und kosteneffizientesten im Vergleich zum Neutralrot-Aufnahmetest und Bicinchoninsäure-Assay bestimmt werden. Die Abnahme der Resazurin-Reduktion ist von der Nachinkubationszeit im Anschluss an die Bestrahlung abhängig. Daher wurden die phototoxischen Effekte aller Furocumarine nach 72 h verglichen. Am Beispiel von 5-MOP und Angelicin konnte gezeigt werden, dass die Phototoxizität nicht nur FC-konzentrationsabhängig war, sondern auch von der applizierten UVA-Dosis abhing. Von den getesteten UVA-Dosen von 0 – 200 mJ/cm² wurde eine Dosis von 125 mJ/cm² zum Vergleich der Phototoxizität aller Furocumarine gewählt. Hierbei wurde 5-MOP mit einem EC₅₀ von 3,3 µg/ml bzw. EC_{50,µM} von 15,5 µM als phototoxischstes Furocumarin der getesteten FC bestimmt, wodurch das phototoxische Potential aller anderen FC über Zuordnung von Äquivalenzfaktoren (PTEF, phototoxicity equivalency factor) über Vergleich der EC₅₀-Werte relativ zu 5-MOP mit PTEF = 1 eingeordnet werden konnte. Diese Werte sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Zur Bestimmung der Photomutagenität wurde der HPRT-Assay verwendet, über den die durch DNA-Schäden induzierte Mutagenität quantitativ über das Auftreten HPRT-defizienter Mutanten bestimmt werden kann. Am Beispiel von 5-MOP und Angelicin konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Mutationsfrequenz sowohl FC-konzentrations- als auch UVA-dosisabhängig strikt linear ansteigt. Die Photomutagenität kann somit als Funktion unter Einführung eines Proportionalitätsfaktors f ausgedrückt werden nach:

$$[\text{Photomutagenität}]_{5\text{-MOP}} = f * [\text{UVA} - \text{Dosis}] * [\text{Konz.}]_{5\text{-MOP}}$$

Der Faktor f blieb über den getesteten Dosisbereich von 50 – 200 mJ/cm² relativ konstant, weshalb frei eine UVA-Dosis von 125 mJ/cm² zum Vergleich der Photomutagenität aller

FCs gewählt werden konnte. Da alle photochemisch aktiven FCs einen strikt linearen Anstieg der Mutationsfrequenz (MF) mit der Konzentration zeigten, wurde die Photomutagenität über die Steigung der Regressionsgeraden der Auftragung MF gegen Konzentration verglichen. Wiederum zeigte 5-MOP das größte photomutagene Potential, weshalb 5-MOP der Äquivalenzfaktor PMEF = 1 zugeordnet wurde, den übrigen FCs entsprechend geringere PMEF, wie aus Tab. 8 ersichtlich.

Photoclastogenität: Die von FCs induzierten Chromosomenmutationen sind clastogener Natur, zu ihrer Detektion wurde der Mikrokerntest verwendet. Analog zum HPRT-Assay zeigte sich am Beispiel von 5-MOP eine strikt lineare Zunahme der mikrokerntragenden Zellen, sowohl konzentrations- als auch UVA-dosisabhängig. In zytotoxischen Konzentrationsbereichen stagnierte die Mikrokernebildung bzw. war rückläufig, da hier aufgrund zytostatisch wirkender DNA-Schäden keine zur Ausbildung von Mikrokerneln benötigte Proliferation mehr stattfand. So wurde zum Vergleich der relativen photoclastogenen Potenz analog zum HPRT-Assay die Steigung der Linearregression bei einer Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA im nicht zytotoxischen Bereich gewählt. Auch hier wurde die Einordnung über Äquivalenzfaktoren im Vergleich zum potentesten FC, 5-MOP, durchgeführt. Die entsprechenden PCEFs sind in Tab. 8 aufgeführt.

Ohne UVA-Bestrahlung konnten in keinem der verwendeten *in vitro*-Assays adverse Effekte festgestellt werden.

Tab. 8: Übersicht und Zusammenfassung der in dieser Arbeit bestimmten Äquivalenzfaktoren

Furocumarin	EC ₅₀ ^b / PTEF	EC _{50,μM} / PTEF _{μM}	PMEF ^b	PMEF _{μM}	PCEF ^b	PCEF _{μM}
5-MOP	3,3 / 1,000	15,5 / 1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
8-MOP	17,0 / 0,197	78,6 / 0,2	0,240	0,240	0,163	0,163
Angelicin	(227,0 / 0,0)	(1219,3 / 0,0)	0,033	0,028	0,004	0,003
Bergamottin ^a	n.d.	n.d.	0,005	0,008	0,001	0,002
Bergaptol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Byakangelicin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DHB	30,1 / 0,1	80,9 / 0,2	0,034	0,058	0,149	0,256
Epoxy- bergamottin	18,7 / 0,2	52,7 / 0,3	0,033	0,054	0,084	0,137
Heraclenin	56,7 / 0,1	198,2 / 0,1	0,047	0,063	0,031	0,041
Imperatorin	21,7 / 0,2	80,3 / 0,2	0,100	0,125	0,066	0,083
Isobergaptin	n.d.	n.d.	Erreichen e. Plateaus ab ca. 15 μg/ml bis MF ca. 60*10 ⁻⁶		0,001	0,001
Isoimperatorin	(178,9 / 0,0)	(662,0 / 0,0)	0,008	0,009	Erreichen e. Plateaus ab 10 μg/ml bei 110*10 ⁻³ MNZ	
Isopimpinellin ^a	n.d.	n.d.	0,003	0,003	n.d.	n.d.
Khellin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Limettin	73,7 / 0,0	357,5 / 0,0	0,023	0,022	0,004	0,004
Oxypeucedanin	9,6 / 0,4	33,4 / 0,5	0,059	0,078	0,119	0,157

Furocumarin	EC ₅₀ ^b / PTEF	EC _{50,μM} / PTEF _{μM}	PMEF ^b	PMEF _{μM}	PCEF ^b	PCEF _{μM}
Oxypeucedanin-hydrat	21,2 / 0,2	69,6 / 0,2	0,048	0,068	0,121	0,170
Pimpinellin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phellopterin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Psoralen ^a	12,0 / 0,3	64,5 / 0,2	0,320	0,275	0,162	0,140
Sphondin	45,0 / 0,1	208,0 / 0,1	0,088	0,088	0,015	0,015
Xanthotoxol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

a = Literaturdaten, berechnet aus (Lohr 2009, Lohr, Raquet and Schrenk 2010); b = Einheit μg/ml

Die Aufstellung eines Äquivalenzfaktoren-Konzepts ist nach allgemeiner Meinung nur bei Vorliegen gleichwertiger toxikologischer Endpunkte, Dosis-Additivität und / oder paralleler Dosis-Wirkungs-Beziehungen (DRC) möglich. Daher wurde durch die Untersuchung verschiedener künstlicher FC-Mischungen und eines natürlichen, FC-haltigen Angelikaextrakts in den zellbasierten Assays auf mögliche Abweichungen von der vermuteten Dosis-Additivität getestet. Verschiedene binäre 5-MOP- und 8-MOP-Mischungen wurden isobolographisch untersucht. Alle Mischungen, darunter auch komplexere mit bis zu neun verschiedenen FCs, wurden bezüglich ihres Interaktions-Index' CI auf Abweichungen von 1 untersucht. Weiterhin wurden über die Äquivalenzfaktoren 5-MOP-Dosisäquivalente berechnet und deren DRCs und EC₅₀-Werte mit denen von 5-MOP verglichen. Bezüglich der Phototoxizität ergaben sich vermutlich aufgrund von Schwierigkeiten bei der Bestimmung des EC₅₀-Wertes der Zellvitalität einige, bezüglich der Photomutagenität und Photoclastogenität kaum Abweichungen, die zudem auf keinen eindeutigen Trend schließen ließen und somit ein Vorliegen von Dosis-Additivität sehr wahrscheinlich machten. Auch ließ der Verlauf der DRC von 5-MOP (variable Konzentration) in Kombination von fixen Konzentrationen 8-MOP, verglichen mit der DRC von reinem 5-MOP, auf Dosis-Additivität schließen.

Bezüglich der Kombination von 5-MOP und UVA-Strahlung konnte ein eindeutig synergistisches Verhalten gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Systeme zur Bestimmung zellfrei photochemisch gebildeter ROS im Mikrotiter-Maßstab etabliert werden. Singulett-Sauerstoff (¹O₂) konnte über die Entfärbung von *N,N*-Dimethyl-*p*-nitrosoanilin detektiert werden. Dabei ergab sich folgende Abstufung für die ¹O₂-Bildung nach einer UVA-Dosis von 25 J/cm²: Psoralen >> Limettin > Angelicin >> Sphondin >> Oxypeucedanin > Heraclenin > 8-MOP > Oxypeucedaninhydrat > Imperatorin > Phellopterin ≈ 5-MOP ≈ Isobergapten > Khellin > Isoimperatorin ≈ Epoxybergamottin ≈ Byakangelicin > Bergamottin ≈ Isopimpinellin > DMSO > Pimpinellin ≈ Bergaptol > DHB ≈ Xanthotoxol. Superoxidradikalanionen (O₂^{•-}) wurden spezifisch über die Reduktion des gelben Farbstoffs Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid (NBT) zu dem blauen Formazan (FMZ) und somit Absorptionszunahme bei 560 nm im Vergleich zur Positivkontrolle Riboflavin detektiert; es ergab sich folgende Reihenfolge nach einer UVA-Dosis von 10 J/cm²: Riboflavin >> Limettin > Sphondin > Psoralen > 5-MOP > Angelicin > Isobergapten > DMSO ≈ Oxypeucedanin ≈ Oxypeucedaninhydrat > Isopimpinellin > Byakangelicin ≈ 8-MOP > Heraclenin >

Pimpinellin > Bergamottin \approx Isoimperatorin > Epoxybergamottin > Phellopterin \approx DHB > Imperatorin > Bergaptol > Xanthotoxol.

Um auf mögliche Ursachen für die generellen Reaktivitätsunterschiede bis hin zur völligen Inaktivität zwischen den einzelnen FC-Derivaten schließen zu können, wurde zunächst mit Hilfe der Absorptionsspektren überprüft, ob eine Absorption der applizierten Photonen überhaupt möglich ist. Die Lage und Intensität der langwelligsten Absorptionsmaxima aller FCs war vergleichbar mit dem von 5-MOP ($\lambda = 314$ nm, $\log \epsilon_{\max} \approx 4$), wodurch eine mangelnde Absorption ausgeschlossen werden konnte. Ebenso konnte eine unterschiedliche Interkalationsfähigkeit, eine weitere Grundvoraussetzung für die Ausbildung eines FC-DNA-Komplexes mit sukzessiver Photoaddition an die DNA, über hypochrome und bathochrome Veränderungen der FC-Absorptionsspektren in Lösung mit doppelsträngiger Kalbsthymus-DNA ausgeschlossen werden: Alle Furocumarine und Limettin waren ähnlich interkalationsfähig. Auch waren Wechselwirkungen mit der DNA im Ethidiumbromid- und Hoechst33258-Kompetitions-Assay vergleichbar.

Generell konnte bezüglich der Reaktivitätsunterschiede festgestellt werden, dass lineare Furocumarine (z.B. 5-MOP) im Vergleich zu ihren angularen Vertretern (z.B. Isobergapten) deutlich weniger photoreaktiv waren. Zu erklären ist dies in erster Linie durch die Fähigkeit linearer FCs zur DNA-Crosslink-Bildung, die angularen fehlt. Auch waren an Pos. 8 substituierte lineare FCs unreaktiver als an Pos. 5 substituierte. Eine ringständige Hydroxygruppe führte zum völligen Reaktivitätsverlust, ebenso wie die Zweitsubstitution der FCs mit einer Methoxygruppe.

Generell ist bei monofunktionalen FCs zu beobachten, dass ihr mutagenes Potential im Vergleich zu 5-MOP deutlich geringer ist als das clastogene, wohingegen bei DHB, Epoxybergamottin, Oxypeucedanin und Oxypeucedaninhydrat das clastogene stärker ausgeprägt ist. Da Angelicine nur Monoaddukte ausbilden können, die mutagen, aber offenbar weniger clastogen sind, ist zu schließen, dass o.g. lineare FCs vermehrt zur Ausbildung von Crosslinks neigen. Auch die vermehrt von Angelicinen und Limettin, nicht jedoch von den o.g. linearen FCs, gebildeten ROS sind eher mutagen und tragen nur in sehr hohen Konzentrationen zur Bildung von Mikrokernen bei. Der vorrangige Effekt ist jedoch die Adduktbildung. Zur weiteren Untersuchung dieses Phänomens müssten zugrundeliegende Effekte näher charakterisiert werden, z.B. durch

- Bestimmung der an die DNA gebundenen FCs über radioaktiv markierte Isotope
- Bestimmung des Monoaddukt / Interstrand-Crosslink-Verhältnisses über Messung der DNA-Schmelztemperatur, alkalische Filterelution oder einen modifizierten Comet-Assay, über den auch oxidative Basenmodifikationen bestimmt werden können
- Bestimmung der Anteile der ROS-vermittelten Apoptose über Durchflusszytometrie.

Die genaue Kenntnis der Wirkmechanismen ist auch für eine mögliche Übertragung dieses Konzepts auf andere Phototoxine wie z.B. Hypericin essentiell.

Mit Hilfe der hier verwendeten Assays konnten *in vitro* die photochemisch induzierten Endpunkte Zytotoxizität, Genmutationen und Chromosomenmutationen detektiert werden. Da zwischen ihnen und der *in vivo* induzierten Erythembildung und Kanzerogenität ein recht gut untersuchter Zusammenhang besteht, konnte mit diesem Modell ein einfaches Instrument zur Risikobewertung komplexer, natürlich vorkommender Furocumarinemische erstellt werden. Bei der *in vivo*-Übertragung ist allerdings zu beachten, dass dieses Modell zwar sehr gut für die Abschätzung möglicher Schäden über

die direkt in der Haut bzw. im Blutplasma gefundene FC-Konzentration geeignet ist, aber dennoch folgende Punkte berücksichtigt werden müssen:

- Absorption
- Metabolismus
- Zeitabhängige Verteilung und Exkretionen
- Lichtabsorption durch endogene Substanzen und Hauttyp
- Reparatur, da die *in vivo* gefundenen FC-Konzentrationen deutlich geringer sind
- Komplexere Reaktionen des Gewebes *in vivo* wie Entzündung oder Krebs

Um all diese Punkte zu berücksichtigen, empfiehlt sich eine computergestützte physiologisch-basierte pharmakokinetische Modellierung (pbpk modeling), in das die in dieser Arbeit bestimmten phototoxischen, photomutagenen und photoclastogenen Potentiale der einzelnen Furocumarine integriert werden können.

9 Literaturverzeichnis

- Abad, M. J., B. de las Heras, A. M. Silvan, R. Pascual, P. Bermejo, B. Rodriguez & A. M. Villar (2001) Effects of furocoumarins from *Cachrys trifida* on some macrophage functions. *J Pharm Pharmacol*, 53, 1163-8.
- Abel, G. & O. Schimmer (1981) Mutagenicity and toxicity of furocoumarins: comparative investigations in 2 test systems. *Mutat Res*, 90, 451-61.
- (1986) Chromosome-damaging effects of heraclenin in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res*, 169, 51-4.
- Aboul-Enein, H. Y., A. Kladna, I. Kruk, K. Lichtszeld & T. Michalska (2003) Effect of psoralens on Fenton-like reaction generating reactive oxygen species. *Biopolymers*, 72, 59-68.
- Abu-Daya, A. & K. R. Fox (1997) Interaction of minor groove binding ligands with long AT tracts. *Nucleic Acids Res*, 25, 4962-9.
- Adam, W. (1981) Die Singulett-Sauerstoff-Story. *Chemie in unserer Zeit*, 15(6), 190-196.
- Agostinis, P., A. Vantieghem, W. Merlevede & P. A. de Witte (2002) Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol*, 34, 221-41.
- Aigner, A. 2006. Karzinogenese. In *Toxikologie für Naturwissenschaftler*, ed. G. F. Fuhrmann. Wiesbaden: B. G. Teubner Verlag.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis & e. al. 2003. *Molekularbiologie der Zelle*. Weinheim, Deutschland: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- Anders, A., W. Poppe, C. Herkt-Maetzky, E. G. Niemann & E. Hofer (1983) Investigations on the mechanism of photodynamic action of different psoralens with DNA. *Biophys Struct Mech*, 10, 11-30.
- Apostolou, A., R. E. Williams & C. R. Comerkeski (1979) Acute toxicity of micronized 8-methoxypsoralen in rodents. *Drug Chem Toxicol*, 2, 309-13.
- Appendino, G., F. Bianchi, A. Bader, C. Campagnuolo, E. Fattorusso, O. Tagliatela-Scafati, M. Blanco-Molina, A. Macho, B. L. Fiebich, P. Bremner, M. Heinrich, M. Ballero & E. Munoz (2004) Coumarins from *Opopanax chironium*. New dihydrofuranocoumarins and differential induction of apoptosis by imperatorin and heraclenin. *J Nat Prod*, 67, 532-6.
- Artuc, M., G. Stuetgen, W. Schalla, H. Schaefer & J. Gazith (1979) Reversible binding of 5- and 8-methoxypsoralen to human serum proteins (albumin) and to epidermis in vitro. *Br J Dermatol*, 101, 669-77.
- Ashwood-Smith, M. J. (1978) Frameshift mutations in bacteria produced in the dark by several furocoumarins; absence of activity of 4,5',8-trimethylpsoralen. *Mutat Res*, 58, 23-7.
- Ashwood-Smith, M. J., O. Ceska & S. K. Chaudhary (1985) Mechanism of photosensitivity reactions to diseased celery. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 290, 1249.
- Ashwood-Smith, M. J., O. Ceska, P. J. Warrington, T. F. Morris & M. Altamirano (1992) The photobiological activity of 5-geranoxypsoralen and its photoproducts. *Photochem Photobiol*, 55, 529-32.
- Ashwood-Smith, M. J., E. L. Grant, J. A. Heddle & G. B. Friedman (1977) Chromosome damage in Chinese hamster cells sensitized to near-ultraviolet light by psoralen and angelicin. *Mutat Res*, 43, 377-85.
- Ashwood-Smith, M. J., G. A. Poulton, M. Barker & M. Mildemberger (1980) 5-Methoxypsoralen, an ingredient in several suntan preparations, has lethal, mutagenic and clastogenic properties. *Nature*, 285, 407-9.

- Ashwood-Smith, M. J., G. A. Poulton & M. Liu (1983) Photobiological activity of 5,7-dimethoxycoumarin. *Experientia*, 39, 262-4.
- Ashwood-Smith, M. J., G. H. Towers, Z. Abramowski, G. A. Poulton & M. Liu (1982) Photobiological studies with dictamnine, a furoquinoline alkaloid. *Mutat Res*, 102, 401-12.
- Aubin, F., P. Humbert & P. Agache (1994) Effects of a new psoralen, 5-geranoxypsoralen, plus UVA radiation on murine ATPase positive Langerhans cells. *J Dermatol Sci*, 7, 176-84.
- Austad, J. & G. Kavli (1983) Phototoxic dermatitis caused by celery infected by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Contact Dermatitis*, 9, 448-51.
- Autier, P., J. F. Dore, J. P. Cesarini & P. Boyle (1997) Should subjects who used psoralen suntan activators be screened for melanoma? Epidemiology and Prevention Subgroup, EORTC Melanoma Cooperative Group EORTC Prevention Research Division. *Ann Oncol*, 8, 435-7.
- Averbeck, D. (1985) Relationship between lesions photoinduced by mono- and bifunctional furocoumarins in DNA and genotoxic effects in diploid yeast. *Mutat Res*, 151, 217-33.
- Averbeck, D., S. Averbeck & F. Dall'Acqua (1981) Mutagenic activity of three monofunctional and three bifunctional furocoumarins in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Farmaco Sci*, 36, 492-505.
- Averbeck, D., S. Averbeck, L. Dubertret, A. R. Young & P. Morliere (1990a) Genotoxicity of bergapten and bergamot oil in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Photochem Photobiol B*, 7, 209-29.
- Averbeck, D., P. Chandra & R. K. Biswas (1975) Structural specificity in the lethal and mutagenic activity of furocoumarins in yeast cells. *Radiat Environ Biophys*, 12, 241-52.
- Averbeck, D., E. Cundari, M. Dardalhon, F. Dall'Acqua & D. Vedaldi (1990b) Genetic effects and repair of DNA photo-adducts induced by 8-methoxypsoralen and homopsoralen (pyranocoumarin) in diploid yeast. *J Photochem Photobiol B*, 5, 179-95.
- Averbeck, D., M. Dardalhon & N. Magana-Schwencke (1990c) Repair of furocoumarin-plus-UVA-induced damage and mutagenic consequences in eukaryotic cells. *J Photochem Photobiol B*, 6, 221-36.
- Averbeck, D. & D. Papadopoulou (1986) Genetic effects of DNA mono- and diadducts photoinduced by furocoumarins in eukaryotic cells. *IARC Sci Publ*, 299-312.
- Averbeck, D., D. Papadopoulou & E. Moustacchi (1988) Repair of 4,5',8-trimethylpsoralen plus light-induced DNA damage in normal and Fanconi's anemia cell lines. *Cancer Res*, 48, 2015-20.
- Babudri, N., B. Pani, S. Venturini, M. Tamaro, C. Monti-Bragadin & F. Bordin (1981) Mutation induction and killing of V79 Chinese hamster cells by 8-methoxypsoralen plus near-ultraviolet light: relative effects of monoadducts and crosslinks. *Mutat Res*, 91, 391-4.
- Bailly, C. (2000) Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem*, 7, 39-58.
- Bailly, C., P. Colson, J. P. Henichart & C. Houssier (1993) The different binding modes of Hoechst 33258 to DNA studied by electric linear dichroism. *Nucleic Acids Res*, 21, 3705-9.
- Ban, H. S., S. S. Lim, K. Suzuki, S. H. Jung, S. Lee, Y. S. Lee, K. H. Shin & K. Ohuchi (2003) Inhibitory effects of furanocoumarins isolated from the roots of *Angelica dahurica* on prostaglandin E2 production. *Planta Med*, 69, 408-12.

- Batista, L. F., B. Kaina, R. Meneghini & C. F. Menck (2009) How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res*, 681, 197-208.
- Baumann, U., R. Dick & B. Zimmerli (1988) Orientierende Untersuchung zum Vorkommen von Furocoumarinen in pflanzlichen Lebensmitteln und Kosmetika. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hygiene*, 79, 112-129.
- Baumgart, A., M. Schmidt, H. J. Schmitz & D. Schrenk (2005) Natural furocoumarins as inducers and inhibitors of cytochrome P450 1A1 in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 69, 657-67.
- Beauchamp, C. O. & I. Fridovich (1973) Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim Biophys Acta*, 317, 50-64.
- Beaumont, P. C., B. J. Parsons, S. Navaratnam, G. O. Phillips & J. C. Allen (1980) The reactivities of furocoumarin excited states with DNA in solution. A laser flash photolysis and fluorescence study. *Biochim Biophys Acta*, 608, 259-65.
- Bech-Thomsen, N., H. R. Angelo & E. A. Knudsen (1992) The influence of food on 8-methoxypsoralen serum concentration and minimal phototoxic dose. *Br J Dermatol*, 127, 620-4.
- Becker, R. S., S. Chakravorti, C. A. Gartner & M. D. Miguel (1993) Photosensitizers - Comprehensive Photophysics/Photochemistry and Theory of Coumarins, Chromones, Their Homologs and Thione Analogs. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*, 89, 1007-1019.
- Behler, A. 2006. Saponin. In *Römpp Lexikon der Lebensmittelchemie*, eds. G. Eisenbrand & P. Schreier. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Beijersbergen van Henegouwen, G. M., E. T. Wijn, S. A. Schoonderwoerd & F. Dall'Acqua (1989a) A method for the determination of PUVA-induced in vivo irreversible binding of 8-methoxypsoralen (8-MOP) to epidermal lipids, proteins and DNA/RNA. *J Photochem Photobiol B*, 3, 631-5.
- Beijersbergen van Henegouwen, G. M., E. T. Wijn, S. A. Schoonderwoerd, H. de Vries & F. Dall'Acqua (1989b) Singlet oxygen mediated photobinding of 8-methoxypsoralen to DNA and genotoxicity in *E. coli*. *Z Naturforsch C*, 44, 819-23.
- Belitz, H.-D., W. Grosch & P. Schieberle. 2008. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Heidelberg Berlin: Springer-Verlag.
- Bellevue, F. H., P. M. Woster, D. J. Edwards, K. He & P. F. Hollenberg (1997) Synthesis and biological evaluation of 6',7'-dihydroxybergamottin (6,7-DHB), a naturally occurring inhibitor of cytochrome P450 3A4. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7, 2593-2598.
- Ben-Hur, E. & M. M. Elkind (1973) Psoralen plus near ultraviolet light inactivation of cultured Chinese hamster cells and its relation to DNA cross-links. *Mutat Res*, 18, 315-24.
- Bendriss, E. K., Y. Bechtel, A. Bendriss, P. H. Humbert, G. Paintaud, J. Magnette, P. Agache & P. R. Bechtel (1996) Inhibition of caffeine metabolism by 5-methoxypsoralen in patients with psoriasis. *Br J Clin Pharmacol*, 41, 421-4.
- Beranek, D. T., C. C. Weis & D. H. Swenson (1980) A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis*, 1, 595-606.
- Berenbaum, M. C. (1981) Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. *Adv Cancer Res*, 35, 269-335.
- (1985) The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J Theor Biol*, 114, 413-31.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko & L. Stryer. 2007. *Stryer Biochemie*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

- Berkley, S. F., A. W. Hightower, R. C. Beier, D. W. Fleming, C. D. Brokopp, G. W. Ivie & C. V. Broome (1986) Dermatitis in grocery workers associated with high natural concentrations of furanocoumarins in celery. *Ann Intern Med*, 105, 351-5.
- Besaratinia, A. & G. P. Pfeifer (2004) Biological consequences of 8-methoxypsoralen-photoinduced lesions: sequence-specificity of mutations and preponderance of T to C and T to a mutations. *J Invest Dermatol*, 123, 1140-6.
- Bethea, D., B. Fullmer, S. Syed, G. Seltzer, J. Tian, C. Rischko, L. Gillespie, D. Brown & F. P. Gasparro (1999) Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *J Dermatol Sci*, 19, 78-88.
- BfR. 2005. Stellungnahme Nr. 029/2005: Risikobewertung genotoxischer und kanzerogener Stoffe soll in der EU harmonisiert werden. ed. B. f. Risikobewertung.
- . 2007. Leitfaden für gesundheitliche Bewertungen. ed. B. f. Risikobewertung.
- . 2008. Information Nr. 031/2008 des BfR vom 12. Juni 2008: Einheitliches, europäisches Konzept für die gesundheitliche Bewertung von Mehrfachrückständen bei Pflanzenschutzmitteln.
- Bickers, D. R. & M. A. Pathak (1984) Psoralen pharmacology: studies on metabolism and enzyme induction. *Natl Cancer Inst Monogr*, 66, 77-84.
- Billard, V., P. L. Gambus, J. Barr, C. F. Minto, L. Corash, J. W. Tessman, J. L. Stickney & S. L. Shafer (1995) The pharmacokinetics of 8-methoxypsoralen following i.v. administration in humans. *Br J Clin Pharmacol*, 40, 347-60.
- Bissonnette, L., J. T. Arnason & M. L. Smith (2008) Real-time fluorescence-based detection of furanocoumarin photoadducts of DNA. *Phytochem Anal*, 19, 342-7.
- Blan, Q. A. & L. I. Grossweiner (1987) Singlet oxygen generation by furocoumarins: effect of DNA and liposomes. *Photochem Photobiol*, 45, 177-83.
- Bode, C. W. 2004. Phototoxikologie der Kaliumkanal-Blocker Psora-3 und Psora-4: In vitro-Untersuchungen zur Photoirritation, Photokarzinogenität und Photoallergenität. In *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Kiel, Deutschland: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*.
- Boelsterli, U. A. 2005. *Mechanistic Toxicology*. Oxon, UK: Taylor&Francis.
- Boiteux, S., E. Gajewski, J. Laval & M. Dizdaroglu (1992) Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry*, 31, 106-10.
- Bonamonte, D., C. Foti, N. Lionetti, L. Rigano & G. Angelini (2010) Photoallergic contact dermatitis to 8-methoxypsoralen in Ficus carica. *Contact Dermatitis*, 62, 343-8.
- Bordin, F., F. Dall'Acqua & A. Guiotto (1991) Angelicins, angular analogs of psoralens: chemistry, photochemical, photobiological and phototherapeutic properties. *Pharmacol Ther*, 52, 331-63.
- Borenfreund, E. & J. A. Puerner (1984) A Simple Quantitative Procedure Using Monolayer Cultures for Cytotoxicity Assays (HTD/NR90). *Journal of Tissue Culture Methods*, 9, 7-9.
- (1985) Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 24, 119-24.
- Bosgra, S., J. C. van Eijkeren & W. Slob (2009) Dose addition and the isobole method as approaches for predicting the cumulative effect of non-interacting chemicals: a critical evaluation. *Critical Reviews in Toxicology*, 39, 418-26.
- Bradbury, S. P., T. C. Feijtel & C. J. Van Leeuwen (2004) Meeting the scientific needs of ecological risk assessment in a regulatory context. *Environ Sci Technol*, 38, 463A-470A.
- Bradley, M. O., B. Bhuyan, M. C. Francis, R. Langenbach, A. Peterson & E. Huberman (1981) Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and

- analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res*, 87, 81-142.
- Braithwaite, E., X. Wu & Z. Wang (1999) Repair of DNA lesions: mechanisms and relative repair efficiencies. *Mutat Res*, 424, 207-19.
- Brendler-Schwaab, S., A. Czich, B. Epe, E. Gocke, B. Kaina, L. Muller, D. Pollet & D. Utesch (2004) Photochemical genotoxicity: principles and test methods. Report of a GUM task force. *Mutat Res*, 566, 65-91.
- Brickl, R., J. Schmid & F. W. Koss (1984) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of psoralens after oral administration: considerations and conclusions. *Natl Cancer Inst Monogr*, 66, 63-7.
- Burger, P. M. & J. W. I. M. Simons (1979) Mutagenicity of 8-Methoxypsoralen and Long-Wave Ultraviolet-Irradiation in V-79 Chinese-Hamster Cells - 1st Approach to a Risk Estimate in Photochemotherapy. *Mutation Research*, 60, 381-389.
- Cadet, J., P. Vigny & W. R. Midden (1990) Photoreactions of furocoumarins with biomolecules. *J Photochem Photobiol B*, 6, 197-206.
- Caffieri, S. (2001) Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) determination of lipophilicity of furocoumarins: relationship with DNA interaction. *J Pharm Sci*, 90, 732-9.
- (2002) Furocoumarin photolysis: chemical and biological aspects. *Photochem Photobiol Sci*, 1, 149-57.
- Caffieri, S., D. Vedaldi, A. Chilin & A. Pozzan (1994) 8-Azapsoralen derivatives: isolation and characterization of the furan-side cycloadducts with DNA. *J Photochem Photobiol B*, 22, 151-5.
- Cai, Y., W. Baer-Dubowska, M. J. Ashwood-Smith, O. Ceska, S. Tachibana & J. DiGiovanni (1996) Mechanism-based inactivation of hepatic ethoxresorufin O-dealkylation activity by naturally occurring coumarins. *Chem Res Toxicol*, 9, 729-36.
- Calcagno, M. P., J. Coll, J. Lloria, F. Faini & M. E. Alonso-Amelot (2002) Evaluation of synergism in the feeding deterrence of some furanocoumarins on *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology*, 28, 175-191.
- Cannistraro, S. & A. Van de Vorst (1977) ESR and optical absorption evidence for free radical involvement in the photosensitizing action of furocoumarin derivatives and for their singlet oxygen production. *Biochim Biophys Acta*, 476, 166-77.
- Cao, H., J. E. Hearst, L. Corash & Y. Wang (2008) LC-MS/MS for the detection of DNA interstrand cross-links formed by 8-methoxypsoralen and UVA irradiation in human cells. *Anal Chem*, 80, 2932-8.
- Caporale, G., G. Innocenti, A. Guiotto, P. Rodighiero & F. Dallacqua (1981) Biogenesis of Linear O-Alkylfuranocoumarins - a New Pathway Involving 5-Hydroxymarmesin. *Phytochemistry*, 20, 1283-1287.
- Carraro, C. & M. A. Pathak (1988) Studies on the nature of in vitro and in vivo photosensitization reactions by psoralens and porphyrins. *J Invest Dermatol*, 90, 267-75.
- Carter, W. H., Jr. (1995) Relating isobolograms to response surfaces. *Toxicology*, 105, 181-8.
- Cartwright, L. E. & J. F. Walter (1983) Psoralen-containing sunscreen is tumorigenic in hairless mice. *J Am Acad Dermatol*, 8, 830-6.
- Cassee, F. R., J. P. Groten, P. J. van Bladeren & V. J. Feron (1998) Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Critical Reviews in Toxicology*, 28, 73-101.

- Cassel, D. M. & S. A. Latt (1980) Relationship between DNA adduct formation and sister chromatid exchange induction by [3H]8-methoxypsoralen in Chinese hamster ovary cells. *Exp Cell Res*, 128, 15-22.
- Cassimeris, L. (1999) Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 134-41.
- Ceska, O., S. K. Chaudhary, P. J. Warrington & M. J. Ashwood-Smith (1986) Furocoumarins in the cultivated carrot, *daucus carota*. *Phytochemistry*, 25, 81-83.
- Chandhoke, N. & B. J. Ghatak (1975) Pharmacological investigations of angelecin--a tranqilloosedative and anticonvulsant agent. *Indian J Med Res*, 63, 833-41.
- Chaudhary, S. K., O. Ceska, C. Tetu, P. J. Warrington, M. J. Ashwood-Smith & G. A. Poulton (1986) Oxypeucedanin, a Major Furocoumarin in Parsley, *Petroselinum crispum*. *Planta Med*, 52, 462-4.
- Chaudhary, S. K., O. Ceska, P. J. Warrington & M. J. Ashwood-Smith (1985) Increased Furocoumarin Content of Celery during Storage. *J Agric Food Chem*, 33, 1153-1157.
- Chen, H., X. Liu & D. J. Patel (1996) DNA bending and unwinding associated with actinomycin D antibiotics bound to partially overlapping sites on DNA. *J Mol Biol*, 258, 457-79.
- Chen, X. & J. Kagan (1993) Photosensitized cleavage and cross-linking of pBR322 DNA with khellin and visnagin. *J Photochem Photobiol B*, 20, 183-9.
- Chiou, C. C. & J. L. Yang (1995) Mutagenicity and specific mutation spectrum induced by 8-methoxypsoralen plus a low dose of UVA in the hprt gene in diploid human fibroblasts. *Carcinogenesis*, 16, 1357-62.
- Choo, K. H. A. (2000) Centromerization. *Trends Cell Biol*, 10, 182-8.
- Chopra, M. 2010. Untersuchungen zur durch UVC-Bestrahlung, Ochratoxin A und Cycloheximid induzierten Apoptose in Leberzellen von Ratte und Mensch sowie zu deren Beeinflussung durch 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. In *Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie*. Kaiserslautern, Deutschland: TU Kaiserslautern.
- Choudhury, H., J. Coglian, R. Hertzberg, D. Mukerjee, G. Rice & LindaTeuschler. 2000. Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures. ed. U.S.EnvironmentalProtectionAgency. Washington, DC.
- Cieri, U. R. (1969) Characterisation of steam nonvolatile residue of bergamot oil and some other essential oils. *J Am Acad Dermatol*, 8, 830-836.
- Cimino, G. D., H. B. Gamper, S. T. Isaacs & J. E. Hearst (1985) Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry. *Annu Rev Biochem*, 54, 1151-93.
- Cohen, L. F., K. H. Kraemer, H. L. Waters, K. W. Kohn & D. L. Glaubiger (1981) DNA crosslinking and cell survival in human lymphoid cells treated with 8-methoxypsoralen and long wavelength ultraviolet radiation. *Mutat Res*, 80, 347-56.
- Cole, R. S. (1971) Psoralen monoadducts and interstrand cross-links in DNA. *Biochim Biophys Acta*, 254, 30-9.
- Cooper, T. G. 1981. *Biochemische Arbeitsmethoden*. Berlin: Walter de Gruyter.
- COT. 1996. Committee on Toxicity, Mutagenicity, Carcinogenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, Toxicity, Mutagenicity and Carcinogenicity Report 1996, <http://www.archive.official-documents.co.uk/document/doh/toxicity/chap-1c.htm> [Oktober 2010].
- Countryman, P. I. & J. A. Heddle (1976) The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res*, 41, 321-32.
- Dall'Acqua, F. (1988) Dark and photochemical interactions between monofunctional furocoumarins and DNA. *Biochem Pharmacol*, 37, 1793-4.

- Dall'Acqua, F. & P. Martelli (1991) Photosensitizing action of furocoumarins on membrane components and consequent intracellular events. *J Photochem Photobiol B*, 8, 235-54.
- Dall'Acqua, F., M. Terbojevich, S. Marciani, D. Vedaldi & M. Recher (1978) Investigation of the dark interaction between furocoumarins and DNA. *Chem Biol Interact*, 21, 103-15.
- Dall'Acqua, F., D. Vedaldi, A. Guiotto, P. Rodighiero, F. Carlassare, F. Baccichetti & F. Bordin (1981) Methyangelicins: new potential agents for the photochemotherapy of psoriasis. Structure-activity study on the dark and photochemical interactions with DNA. *J Med Chem*, 24, 806-11.
- Davies, M. J. (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun*, 305, 761-70.
- de Castro, W. V., S. Mertens-Talcott, H. Derendorf & V. Butterweck (2007) Grapefruit juice-drug interactions: Grapefruit juice and its components inhibit P-glycoprotein (ABCB1) mediated transport of talinolol in Caco-2 cells. *J Pharm Sci*, 96, 2808-17.
- de Mol, N. J., G. M. Beijersbergen van Henegouwen, G. R. Mohn, B. W. Glickman & P. M. van Kleef (1981) On the involvement of singlet oxygen in mutation induction by 8-methoxypsoralen and UVA irradiation in Escherichia coli K-12. *Mutat Res*, 82, 23-30.
- De Silva, I. U., P. J. McHugh, P. H. Clingen & J. A. Hartley (2000) Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 20, 7980-90.
- de Wolff, F. A. & T. V. Thomas (1986) Clinical pharmacokinetics of methoxsalen and other psoralens. *Clin Pharmacokinet*, 11, 62-75.
- Dean, R. T., S. Fu, R. Stocker & M. J. Davies (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 324 (Pt 1), 1-18.
- Decuyper, J., J. Piette & A. Van de Vorst (1983) Activated oxygen species produced by photoexcited furocoumarin derivatives. *Arch Int Physiol Biochim*, 91, 471-6.
- Dellarco, V. L., K. H. Mavournin & R. R. Tice (1985) Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions. *Environ Mutagen*, 7, 405-24.
- Diawara, M. M., T. Allison, P. Kulkosky & D. E. Williams (1997) Psoralen-induced growth inhibition in Wistar rats. *Cancer Lett*, 114, 159-60.
- Diawara, M. M., K. J. Chavez, P. B. Hoyer, D. E. Williams, J. Dorsch, P. Kulkosky & M. R. Franklin (1999) A novel group of ovarian toxicants: the psoralens. *J Biochem Mol Toxicol*, 13, 195-203.
- Diawara, M. M., K. J. Chavez, D. Simpleman, D. E. Williams, M. R. Franklin & P. B. Hoyer (2001) The psoralens adversely affect reproductive function in male wistar rats. *Reprod Toxicol*, 15, 137-44.
- Diawara, M. M. & P. J. Kulkosky (2003) Reproductive toxicity of the psoralens. *Pediatr Pathol Mol Med*, 22, 247-58.
- Diawara, M. M., J. T. Trumble, K. K. White, W. G. Carson & L. A. Martinez (1993) Toxicity of Linear Furanocoumarins to *Spodoptera-Exigua* - Evidence for Antagonistic Interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 19, 2473-2484.
- Diffey, B. L. (1991) Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Phys Med Biol*, 36, 299-328.
- (2002a) Human exposure to solar ultraviolet radiation. *J Cosmet Dermatol*, 1, 124-30.
- (2002b) Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, 28, 4-13.
- DiGiovanni, J. (1992) Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Ther*, 54, 63-128.
- Doehmer, J. (1993) V79 Chinese hamster cells genetically engineered for cytochrome P450 and their use in mutagenicity and metabolism studies. *Toxicology*, 82, 105-18.

- Doehmer, J. & F. Oesch (1991) V79 Chinese hamster cells genetically engineered for stable expression of cytochromes P450. *Methods Enzymol*, 206, 117-23.
- Dronkert, M. L. & R. Kanaar (2001) Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res*, 486, 217-47.
- Dunnick, J. K. 1989. National Toxicology Program (NTP) technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of 8-methoxypsoralen (CAS NO. 298-81-7) in F344/N rats (gavage studies), NIH Publication No. 89-2814. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health.
- Dunnick, J. K., W. E. Davis, Jr., T. A. Jorgenson, V. J. Rosen & E. E. McConnell (1984) Subchronic toxicity in rats administered oral 8-methoxypsoralen. *Natl Cancer Inst Monogr*, 66, 91-5.
- Duthie, M. S., I. Kimber & M. Norval (1999) The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. *Br J Dermatol*, 140, 995-1009.
- Eastmond, D. A. & D. Pinkel (1990) Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA probes. *Mutat Res*, 234, 303-18.
- ECHA. 2008. Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Part B: Hazard Assessment. ed. European Chemicals Agency.
- Eckardt-Schupp, F. & F. Ahne. 1993. Molekulare Methoden der Mutationsanalyse in Säugerzellen. In *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, ed. R. Fahrig. Darmstadt: wissenschaftliche Buchgesellschaft.
- Efferth, T. 2006. *Molekulare Pharmakologie und Toxikologie*. Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Ehrsson, H., S. Eksborg & H. Wallin (1978) Metabolism of 8-Methoxypsoralen in Man: Identification and Quantification of 8-Hydroxypsoralen. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2, 125-128.
- Ehrsson, H., I. Wallin, A. M. Ros, S. Eksborg & M. Berg (1994) Food-induced increase in bioavailability of 5-methoxypsoralen. *Eur J Clin Pharmacol*, 46, 375-7.
- Eichman, B. F., B. H. Mooers, M. Alberti, J. E. Hearst & P. S. Ho (2001) The crystal structures of psoralen cross-linked DNAs: drug-dependent formation of Holliday junctions. *J Mol Biol*, 308, 15-26.
- Eisenbrand, G. (2007) Toxicological assessment of furocoumarins in foodstuffs. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 367-373.
- Eisenbrand, G. & P. Schreier. 2006. *Römpp Lexikon Lebensmittelchemie*. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag.
- El-Gogary, T. M. & E. M. El-Gendy (2003) Noncovalent attachment of psoralen derivatives with DNA: Hartree-Fock and density functional studies on the probes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 59, 2635-44.
- el-Masri, H. A., R. S. Thomas, S. A. Benjamin & R. S. Yang (1995) Physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of chemical mixtures and possible applications in risk assessment. *Toxicology*, 105, 275-82.
- Elkind, M. M. & H. Sutton (1959) X-ray damage and recovery in mammalian cells in culture. *Nature*, 184, 1293-5.
- Elledge, S. J. (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, 274, 1664-72.
- Emerit, I. (1994) Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med*, 16, 99-109.
- Encyclopaedia Britannica. 2010. Photochemistry.
- Epe, B. (1991) Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem Biol Interact*, 80, 239-60.

- Erexson, G. L., M. V. Periago & C. S. Spicer (2001) Differential sensitivity of Chinese hamster V79 and Chinese hamster ovary (CHO) cells in the in vitro micronucleus screening assay. *Mutat Res*, 495, 75-80.
- European Commission. 2000. First Report on the Harmonisation of Risk Assessment Procedures. Scientific Steering Committee's Working Group on the Harmonisation of Risk Assessment Procedures in the Scientific Committees advising the European Commission in the Area of Human and Environmental Health.
- Fay, R. M. & V. J. Feron (1996) Complex mixtures: hazard identification and risk assessment. *Food Chem Toxicol*, 34, 1175-6.
- FDA. 2003. Guidance for Industry Photosafety Testing. ed. F. U.S. DHH, CDER. Rockville, MD 20857, USA.
- Felsenfeld, G. & M. Groudine (2003) Controlling the double helix. *Nature*, 421, 448-53.
- Fenech, M. (1997) The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res*, 392, 11-8.
- (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*, 455, 81-95.
- Feron, V. J., F. R. Cassee & J. P. Groten (1998) Toxicology of chemical mixtures: international perspective. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 6, 1281-9.
- Feron, V. J., J. P. Groten, D. Jonker, F. R. Cassee & P. J. van Bladeren (1995) Toxicology of chemical mixtures: challenges for today and the future. *Toxicology*, 105, 415-27.
- Feron, V. J., J. P. Groten & P. J. van Bladeren (1998) Exposure of humans to complex chemical mixtures: hazard identification and risk assessment. *Arch Toxicol Suppl*, 20, 363-73.
- Fisher, D. E. (2001) The p53 tumor suppressor: critical regulator of life & death in cancer. *Apoptosis*, 6, 7-15.
- Fitzpatrick, T. B. & M. A. Pathak (1984) Research and development of oral psoralen and longwave radiation photochemotherapy: 2000 B.C.-1982 A.D. *Natl Cancer Inst Monogr*, 66, 3-11.
- Floss, H. G. & u. Mothes (1966) On the Biosynthesis of Furocoumarins in *Pimpinella Magna*. *Phytochemistry*, 5, 161-169.
- Ford, D. K. & G. Yerganian (1958) Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture. *J Natl Cancer Inst*, 21, 393-425.
- Frötschl, R. 2007. GenTox-Prüfstrategie für Chemikalien. In *DGPT-Weiterbildungskurs Chemische Kanzerogenese und Mutagenese*. München-Neuherberg.
- Fuhr, U. (1998) Drug interactions with grapefruit juice. Extent, probable mechanism and clinical relevance. *Drug Saf*, 18, 251-72.
- Fujioka, T., K. Furumi, H. Fujii, H. Okabe, K. Mihashi, Y. Nakano, H. Matsunaga, M. Katano & M. Mori (1999) Antiproliferative constituents from umbelliferae plants. V. A new furanocoumarin and falcariindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 47, 96-100.
- Fukuda, K., L. Guo, N. Ohashi, M. Yoshikawa & Y. Yamazoe (2000) Amounts and variation in grapefruit juice of the main components causing grapefruit-drug interaction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 741, 195-203.
- Gast, W., M. Rytter, T. Walther & A. Y. Potapenko (1991) Evaluation of the phototoxicity of natural furocoumarin derivatives. *Dermatologische Monatsschrift*, 177, 565-569.
- Gawron, A. & K. Glowniak (1987) Cytostatic Activity of Coumarins In vitro. *Planta Medica*, 526-529.
- Gervais, J. L., P. Seth & H. Zhang (1998) Cleavage of CDK inhibitor p21(Cip1/Waf1) by caspases is an early event during DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 273, 19207-12.
- Girenavar, B., G. K. Jayaprakasha, Y. Jadegoud, G. A. N. Gowda & B. S. Patil (2007a) Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergaptol and

- geranylcoumarin from grapefruit. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 3684-3691.
- Girenavar, B., G. K. Jayaprakasha & B. S. Patil (2007b) Potent inhibition of human cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 isoenzymes by grapefruit juice and its furocoumarins. *J Food Sci*, 72, C417-21.
- Girotti, A. W. (1990) Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem Photobiol*, 51, 497-509.
- GisChemBGRCl. 2010. Sicherheitsdatenblatt N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) (Labor).
- Glatt, H. 1993. HPRT-Genmutationstest in V79-Zellen des Chinesischen Hamsters. In *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, ed. R. Fahrig. Darmstadt: wissenschaftliche Buchgesellschaft.
- Glazer, A. N. & H. S. Rye (1992) Stable dye-DNA intercalation complexes as reagents for high-sensitivity fluorescence detection. *Nature*, 359, 859-61.
- Glynn, J. M., T. G. Cotter & D. R. Green (1992) Apoptosis induced by Actinomycin D, Camptothecin or Aphidicolin can occur in all phases of the cell cycle. *Biochem Soc Trans*, 20, 84S.
- Gniazdowski, M. & C. Cera (1996) The Effects of DNA Covalent Adducts on in Vitro Transcription. *Chem Rev*, 96, 619-634.
- Godar, D. E. (1999) Light and death: photons and apoptosis. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 4, 17-23.
- (2005) UV doses worldwide. *Photochem Photobiol*, 81, 736-49.
- Gorgus, E., C. Lohr, N. Raquet, S. Guth & D. Schrenk (2010) Limettin and furocoumarins in beverages containing citrus juices or extracts. *Food Chem Toxicol*, 48, 93-8.
- Grant, E. L., R. C. von Borstel & M. J. Ashwood-Smith (1979) Mutagenicity of cross-links and monoadducts of furocoumarins (psoralen and angelicin) induced by 360-nm radiation in excision-repair-defective and radiation-insensitive strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mutagen*, 1, 55-63.
- Groten, J. P., V. J. Feron & J. Suhnel (2001) Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 316-22.
- Gruenert, D. C., M. Ashwood-Smith, R. H. Mitchell & J. E. Cleaver (1985) Induction of DNA-DNA cross-link formation in human cells by various psoralen derivatives. *Cancer Res*, 45, 5394-8.
- Grundmann-Kollmann, M., I. Tegeder, F. R. Ochsendorf, T. M. Zollner, R. Ludwig, R. Kaufmann & M. Podda (2001) Kinetics and dose-response of photosensitivity in cream psoralen plus ultraviolet A photochemotherapy: comparative in vivo studies after topical application of three standard preparations. *Br J Dermatol*, 144, 991-5.
- Guo, L. Q., K. Fukuda, T. Ohta & Y. Yamazoe (2000) Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition of human CYP3A activity. *Drug Metab Dispos*, 28, 766-71.
- Guo, L. Q. & Y. Yamazoe (2004) Inhibition of cytochrome P450 by furanocoumarins in grapefruit juice and herbal medicines. *Acta Pharmacol Sin*, 25, 129-36.
- Guth, S. 2006. Furocoumarine. In *Römpp Lexikon der Lebensmittelchemie*, eds. G. Eisenbrand & P. Schreier. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Habermeyer, M. 2005. Wirkmechanistische Untersuchungen zur Beeinflussung humaner Topoisomerasen durch Anthocyanidine, sowie Einfluss der Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) auf die Wirkung von Topoisomerasegiften. In *Lebensmittelchemie / Umwelttoxikologie*. Kaiserslautern, Deutschland: TU Kaiserslautern.
- Halliwell, B. & J. M. C. Gutteridge. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford New York: Oxford University Press.

- Hanahan, D. & R. A. Weinberg (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hanawalt, P. C., S. C. Liu & C. S. Parsons (1981) DNA repair responses in human skin cells. *J Invest Dermatol*, 77, 86-90.
- Hara, T., T. Nishikawa, H. Sui, K. Kawakami, H. Matsumoto & N. Tanaka (2007) In vivo photochemical skin micronucleus test using a sunlight simulator: detection of 8-methoxypsoralen and benzo[a]pyrene in hairless mice. *Mutat Res*, 631, 1-8.
- Hardy, C. D., N. J. Crisona, M. D. Stone & N. R. Cozzarelli (2004) Disentangling DNA during replication: a tale of two strands. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359, 39-47.
- Heddle, J. A., M. C. Cimino, M. Hayashi, F. Romagna, M. D. Shelby, J. D. Tucker, P. Vanparys & J. T. MacGregor (1991) Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ Mol Mutagen*, 18, 277-91.
- Heim, S., B. Johansson & F. Mertens (1989) Constitutional chromosome instability and cancer risk. *Mutat Res*, 221, 39-51.
- Henderson, L., S. Albertini & M. Aardema (2000) Thresholds in genotoxicity responses. *Mutat Res*, 464, 123-8.
- Heng, H. H., S. Goetze, C. J. Ye, G. Liu, J. B. Stevens, S. W. Bremer, S. M. Wykes, J. Bode & S. A. Krawetz (2004) Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J Cell Sci*, 117, 999-1008.
- Henriksen, M., R. Na, M. S. Agren & H. C. Wulf (2004) Minimal erythema dose after multiple UV exposures depends on pre-exposure skin pigmentation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 20, 163-9.
- Hermens, J. L. (1990) Electrophiles and acute toxicity to fish. *Environ Health Perspect*, 87, 219-25.
- Herold, H., B. Berbey, D. Angignard & R. Le Duc. 1981. Toxicological study of the compound 5-methoxypsoralen (5-MOP). In *Psoralens in Cosmetics and Dermatology*, eds. J. Cahn, P. Forlot, C. Grupper, A. Maybeck & F. Urbach. New York: Pergamon Press.
- Hiller, K. & M. F. Melzig. 2006. *Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen*. Erfstadt: area verlag gmbh.
- HMPC. 2007. Reflection Paper on the Risks associated with Furocoumarins Contained in Preparations of Angelica Archangelica L. In *EMEA/HMPC/317913/2006*, ed. European Medicines Agency (EMA). London.
- Höffeler, F. (2004) Chronik eines angekündigten Todes: Die Maschinerie der Apoptose. *Biologie in unserer Zeit*, 34, 16-23.
- Hönigsmann, H. (2002) Erythema and pigmentation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 18, 75-81.
- Hudson, J. B. (1989) Plant photosensitizers with antiviral properties. *Antiviral Res*, 12, 55-74.
- IARC (1980) 8-Methoxypsoralen. *IARC Monographs*, 24, 101-124.
- (1986) 5-Methoxypsoralen. *IARC Monographs*, 40, 327-347.
- Isaacs, S. T., G. Wieseahn & L. M. Hallick (1984) In vitro characterization of the reaction of four psoralen derivatives with DNA. *Natl Cancer Inst Monogr*, 66, 21-30.
- Ishikawa, A., T. Kuma, H. Sasaki, N. Sasaki, Y. Ozeki, N. Kobayashi & Y. Kitamura (2009) Constitutive expression of bergapton O-methyltransferase in *Glehnia littoralis* cell cultures. *Plant Cell Rep*, 28, 257-65.
- Ivie, G. W. (1978) Linear furocoumarins (psoralens) from the seed of Texas *Ammi majus* L. (Bishop's Weed). *J Agric Food Chem*, 26, 1394-1402.
- Ivie, G. W., D. L. Holt & M. C. Ivey (1981) Natural toxicants in human foods: psoralens in raw and cooked parsnip root. *Science*, 213, 909-10.

- Ivie, G. W., J. T. Macgregor & B. D. Hammock (1980) Mutagenicity of psoralen epoxides. *Mutat Res*, 79, 73-7.
- Jalal, F., C. Jumarie, W. Bawab, D. Corbeil, C. Malo, A. Berteloot & P. Crine (1992) Polarized distribution of neutral endopeptidase 24.11 at the cell surface of cultured human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochem J*, 288 (Pt 3), 945-51.
- Jenkins, G. J., S. H. Doak, G. E. Johnson, E. Quick, E. M. Waters & J. M. Parry (2005) Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents? *Mutagenesis*, 20, 389-98.
- Jenssen, D. 1984. A Quantitative Test for Mutagenicity in V79 Chinese Hamster Cells. In *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, eds. B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols & C. Ramel. Elsevier Science Publishers BV.
- John, B. A., L. F. Chasseaud, S. G. Wood & P. Forlot (1992) Metabolism of the anti-psoriatic agent 5-methoxypsoralen in humans: comparison with rat and dog. *Xenobiotica*, 22, 1339-51.
- Joshi, P. C. (1985) Comparison of the DNA-damaging property of photosensitised riboflavin via singlet oxygen (1O_2) and superoxide radical O_2^- . mechanisms. *Toxicol Lett*, 26, 211-7.
- Joshi, P. C. & M. A. Pathak (1983) Production of singlet oxygen and superoxide radicals by psoralens and their biological significance. *Biochem Biophys Res Commun*, 112, 638-46.
- Jung, V., P. S. Song & M. L. Harter (1983) The photobinding of 5,7-dimethoxycoumarin to adenovirus type-2 DNA. A method for in vitro mutagenesis. *Biochim Biophys Acta*, 740, 64-72.
- Kaina, B. 1993. Mechanismen der DNA-Reparatur und der Mutagenese. In *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, ed. R. Fahrig. Darmstadt: wissenschaftliche Buchgesellschaft.
- Kaina, B. & J. G. Hengstler. 2004. Haben Karzinogene eine Schwellendosis? - Pro und Contra. In *Regulatorische Toxikologie*, eds. F. X. Reichl & M. Schwenk. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer Verlag.
- Kalweit, S., D. Utesch, W. von der Hude & S. Madle (1999) Chemically induced micronucleus formation in V79 cells--comparison of three different test approaches. *Mutat Res*, 439, 183-90.
- Kammerau, B., U. Klebe, A. Zesch & H. Schaefer (1976) Penetration, permeation, and resorption of 8-methoxypsoralen. Comparative in vitro and in vivo studies after topical application of four standard preparations. *Arch Dermatol Res*, 255, 31-42.
- Kang, H. K., E. J. Shin & S. C. Shim (1992) Transient absorption spectra and quenching of coumarin excited states by nucleic acid bases. *J Photochem Photobiol B*, 13, 19-28.
- Kavli, G., K. Midelfart, J. Raa & G. Volden (1983a) Photo-Toxicity from Furocoumarins (Psoralens) of *Heracleum-Laciniatum* in a Patient with Vitiligo - Action Spectrum Studies on Bergapten, Pimpinellin, Angelicin and Sphondin. *Contact Dermatitis*, 9, 364-366.
- Kavli, G., J. Raa, B. E. Johnson, G. Volden & S. Haugsbo (1983b) Furocoumarins of *Heracleum laciniatum*: isolation, phototoxicity, absorption and action spectra studies. *Contact Dermatitis*, 9, 257-62.
- Kelly, K. A., C. M. Havrilla, T. C. Brady, K. H. Abramo & E. D. Levin (1998) Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ Health Perspect*, 106, 375-84.
- Kent, U. M., H. L. Lin, K. R. Noon, D. L. Harris & P. F. Hollenberg (2006) Metabolism of bergamottin by cytochromes P450 2B6 and 3A5. *J Pharmacol Exp Ther*, 318, 992-1005.

- Kersten, B., P. Kasper, S. Y. Brendler-Schwaab & L. Muller (2002) Use of the photo-micronucleus assay in Chinese hamster V79 cells to study photochemical genotoxicity. *Mutat Res*, 519, 49-66.
- Kersten, B., J. Zhang, S. Y. Brendler-Schwaab, P. Kasper & L. Muller (1999) The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutat Res*, 445, 55-71.
- Khanna, K. K. & S. P. Jackson (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, 27, 247-54.
- Kim, Y. K., Y. S. Kim & S. Y. Ryu (2007) Antiproliferative effect of furanocoumarins from the root of *Angelica dahurica* on cultured human tumor cell lines. *Phytotherapy Research*, 21, 288-290.
- Kirby, T. W. & I. Fridovich (1982) A picomolar spectrophotometric assay for superoxide dismutase. *Anal Biochem*, 127, 435-40.
- Kirsch-Volders, M., M. Aardema & A. Elhajouji (2000) Concepts of threshold in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*, 464, 3-11.
- Kitamura, N., S. Kohtani & R. Nakagaki (2005) Molecular aspects of furocoumarin reactions: Photophysics, photochemistry, photobiology, and structural analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C-Photochemistry Reviews*, 6, 168-185.
- Klotz, L. O., K. D. Kroncke & H. Sies (2003) Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem Photobiol Sci*, 2, 88-94.
- Knudson, E. A. & S. Kroon (1988) Invitro and Invivo Phototoxicity of Furocoumarin-Containing Plants. *Clinical and Experimental Dermatology*, 13, 92-96.
- Koenigs, L. L. & W. F. Trager (1998a) Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2B1 by 8-methoxypsoralen and several other furanocoumarins. *Biochemistry*, 37, 13184-93.
- (1998b) Mechanism-based inactivation of P450 2A6 by furanocoumarins. *Biochemistry*, 37, 10047-61.
- Kohn, K. W. (1991) Principles and practice of DNA filter elution. *Pharmacol Ther*, 49, 55-77.
- Konemann, H. (1981) Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: a proposal for a quantitative approach and experimental results. *Toxicology*, 19, 229-38.
- Korffmacher, H., R. Hartwig, U. Matthes, T. Dirschka, A. Albassam, N. Weindorf & P. Altmeyer (1994) Contact allergy to 8-methoxypsoralen. *Contact Dermatitis*, 30, 283-5.
- Kornhauser, A., W. G. Wamer & A. L. Giles, Jr. (1982) Psoralen phototoxicity: correlation with serum and epidermal 8-methoxypsoralen and 5-methoxypsoralen in the guinea pig. *Science*, 217, 733-5.
- (1984) Difference in topical and systemic reactivity of psoralens: determinations of epidermal and serum levels. *Natl Cancer Inst Monogr*, 66, 97-101.
- Korycka-Dahl, M. B. & T. Richardson (1977) Photogeneration of Superoxide Anion in Serum Milk of Bovine Milk and in Model Systems Containing Riboflavin and Amino Acids. *Journal of Dairy Science*, 61, 400-407.
- Kosmetik-Verordnung (2007) Kosmetik-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 7.10.1997 (BGBl. I S.2410). zuletzt geändert durch Artikel 8 der Verordnung vom 8.8.2007.
- Krahn, D. F. (1983) Chinese hamster cell mutagenesis: a comparison of the CHO and V79 systems. *Ann N Y Acad Sci*, 407, 231-8.
- Kraljic, I. (1986) Detection of singlet oxygen and its role in dye-sensitized photooxidation in aqueous and micellar solutions. *Biochimie*, 68, 807-11.

- Kraljic, I. & S. El Mohsni (1978) A new Method for the Detection of Singlet Oxygen in Aqueous Solution. *Photochemistry and Photobiology*, 28, 577-581.
- Krasnovskii, A. A., V. L. Sukhorukov & A. Potapenko (1983) [Photogeneration of singlet oxygen by psoralens]. *Biull Eksp Biol Med*, 96, 59-61.
- Kubinyi, H. (1997) QSAR and 3D QSAR in drug design .1. methodology. *Drug Discovery Today*, 2, 457-467.
- Kühn, K. (1974) Struktur und Biochemie des Kollagens. *Chemie in unserer Zeit*, 8(4), 97-103.
- Kuraoka, I., W. R. Kobertz, R. R. Ariza, M. Biggerstaff, J. M. Essigmann & R. D. Wood (2000) Repair of an interstrand DNA cross-link initiated by ERCC1-XPF repair/recombination nuclease. *J Biol Chem*, 275, 26632-6.
- Lai, C., H. Cao, J. E. Hearst, L. Corash, H. Luo & Y. Wang (2008) Quantitative analysis of DNA interstrand cross-links and monoadducts formed in human cells induced by psoralens and UVA irradiation. *Anal Chem*, 80, 8790-8.
- Laquerbe, A., C. Guillouf, E. Moustacchi & D. Papadopoulo (1995a) The mutagenic processing of psoralen photolesions leaves a highly specific signature at an endogenous human locus. *J Mol Biol*, 254, 38-49.
- Laquerbe, A., E. Moustacchi & D. Papadopoulo (1995b) Genotoxic potential of psoralen cross-links versus monoadducts in normal human lymphoblasts. *Mutat Res*, 346, 173-9.
- Laskin, J. D. (1989) Mechanisms of Psoralen Action in the Skin. *Journal of the American College of Toxicology*, 8, 797-800.
- (1994) Cellular and molecular mechanisms in photochemical sensitization: studies on the mechanism of action of psoralens. *Food Chem Toxicol*, 32, 119-27.
- Lawley, P. D. & C. J. Thatcher (1970) Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. The influence of cellular thiol concentrations on the extent of methylation and the 6-oxygen atom of guanine as a site of methylation. *Biochem J*, 116, 693-707.
- Lehmann, L., J. Wagner & M. Metzler (2006) Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food Chem Toxicol*, 44, 398-408.
- Lelièvre, D., P. Justine, F. Christiaens, N. Bonaventure, J. Coutet, L. Marrot & J. Cotovio (2007) The EpiSkin phototoxicity assay (EPA): development of an in vitro tiered strategy using 17 reference chemicals to predict phototoxic potency. *Toxicol In Vitro*, 21, 977-95.
- Lin, H. L., U. M. Kent & P. F. Hollenberg (2005) The grapefruit juice effect is not limited to cytochrome P450 (P450) 3A4: evidence for bergamottin-dependent inactivation, heme destruction, and covalent binding to protein in P450s 2B6 and 3A5. *J Pharmacol Exp Ther*, 313, 154-64.
- Lindl, T. & J. Bauer. 2002. *Zell- und Gewebekultur - Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. 5. überarbeitete und erweiterte Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Liochev, S. I. & I. Fridovich (1994) The role of O₂·- in the production of HO·: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, 16, 29-33.
- Liu-Lee, V. W., J. A. Heddle & C. F. Arlett (1984a) Repair of 8-methoxypsoralen monoadducts in mouse lymphoma cells. *Mutat Res*, 132, 73-8.
- Liu-Lee, V. W., J. A. Heddle, C. F. Arlett & B. Broughton (1984b) Genetic effects of specific DNA lesions in mammalian cells. *Mutat Res*, 127, 139-47.
- Liu, Z., Y. Lu, M. Lebwohl & H. Wei (1999) PUVA (8-methoxy-psoralen plus ultraviolet A) induces the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and DNA fragmentation

- in calf thymus DNA and human epidermoid carcinoma cells. *Free Radic Biol Med*, 27, 127-33.
- Ljunggren, B. (1990) Severe phototoxic burn following celery ingestion. *Arch Dermatol*, 126, 1334-6.
- Lohr, C. 2008. Forschungspraktikum: Etablierung einer geeigneten Extraktionsmethode zur Bestimmung von Furocumarinen in Limetten und deren Zubereitungen. In *Lebensmittelchemie&Umwelttoxikologie*. Kaiserslautern, Germany: TU Kaiserslautern.
- . 2009. Untersuchungen zur Mutagenität an ausgewählten Furocumarinen. In *Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie*. Kaiserslautern, Deutschland: TU Kaiserslautern.
- Lohr, C., N. Raquet & D. Schrenk (2010) Application of the concept of relative photomutagenic potencies to selected furocoumarins in V79 cells. *Toxicol In Vitro*, 24, 558-66.
- Loontjens, F. G., P. Regenfuss, A. Zechel, L. Dumortier & R. M. Clegg (1990) Binding characteristics of Hoechst 33258 with calf thymus DNA, poly[d(A-T)], and d(CCGGAATTCCGG): multiple stoichiometries and determination of tight binding with a wide spectrum of site affinities. *Biochemistry*, 29, 9029-39.
- Loveday, K. S. (1996) Interrelationship of photocarcinogenicity, photomutagenicity and phototoxicity. *Photochem Photobiol*, 63, 369-72.
- Loveday, K. S. & B. A. Donahue (1984) Induction of sister chromatid exchanges and gene mutations in Chinese hamster ovary cells by psoralens. *Natl Cancer Inst Monogr*, 66, 149-55.
- Lowe, N. J., F. Urbach, P. Bailin & D. P. Weingarten (1987) Comparative efficacy of two dosage forms of oral methoxsalen in psoralens plus ultraviolet A therapy of psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, 16, 994-8.
- Lowndes, N. F. & J. R. Murguia (2000) Sensing and responding to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev*, 10, 17-25.
- Madle, S., B. Beek & C. Nowak. 1993. Zum Verständnis von Chromosomenmutationstests an Somazellen. In *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, ed. R. Fahrig. Darmstadt: wissenschaftliche Buchgesellschaft.
- Mahler, H. R., B. Kline & B. D. Mehrotra (1964) Some Observations on the Hypochromism of DNA. *J Mol Biol*, 9, 801-11.
- Mantulin, W. W. & P. S. Song (1973) Excited states of skin-sensitizing coumarins and psoralens. Spectroscopic studies. *J Am Chem Soc*, 95, 5122-9.
- Marchant, Y. Y., M. Turjman, T. Flynn, F. Balza, J. C. Mitchell & G. H. N. Towers (1985) Identification of Psoralen, 8-Methoxypsoralen, Isopimpinellin, and 5,7-Dimethoxycoumarin in *Pelea-Anisata* Mann, H. *Contact Dermatitis*, 12, 196-199.
- Marnett, L. J. (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*, 424, 83-95.
- Marnett, L. J., J. N. Riggins & J. D. West (2003) Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest*, 111, 583-93.
- Marquardt, H. & S. Schäfer. 2004. *Lehrbuch der Toxikologie*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Marquez, N., R. Sancho, M. Ballero, P. Bremner, G. Appendino, B. L. Fiebich, M. Heinrich & E. Munoz (2004) Imperatorin inhibits T-cell proliferation by targeting the transcription factor NFAT. *Planta Med*, 70, 1016-21.
- Marrot, L. & J. R. Meunier (2008) Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J Am Acad Dermatol*, 58, S139-48.

- Martelli, P., L. Bovalini, S. Ferri, G. G. Franchi & M. Bari (1985) Active oxygen forms in photoreaction between DNA and furanochromones khellin and visnagin. *FEBS Lett*, 189, 255-7.
- Mary, S., P. Muret, S. Makki, M. Jourdan, J. P. Belon, J. P. Kantelip, J. C. Henry & P. Humbert (1998) Assessment of the recovery of three lipophilic psoralens by microdialysis: an in vitro study. *International Journal of Pharmaceutics*, 161, 7-13.
- Marzin, D. (1997) The position of the in vitro micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines. *Mutat Res*, 392, 175-81.
- Marzulli, F. N. & H. I. Maibach (1970) Perfume Phototoxicity. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 21, 695-&.
- Matsuda, H., N. Hirata, Y. Kawaguchi, M. Yamazaki, S. Naruto, M. Shibano, T. I. Masahiko, K. Baba & M. Kubo (2005) Melanogenesis stimulation in murine B16 melanoma cells by Umbelliferae plant extracts and their coumarin constituents. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1229-1233.
- Mays, D. C., C. Camisa, P. Cheney, C. M. Pacula, S. Nawoot & N. Gerber (1987) Methoxsalen is a potent inhibitor of the metabolism of caffeine in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 42, 621-6.
- Mays, D. C., J. B. Hilliard, D. D. Wong & N. Gerber (1989) Activation of 8-methoxypsoralen by cytochrome P-450. Enzyme kinetics of covalent binding and influence of inhibitors and inducers of drug metabolism. *Biochem Pharmacol*, 38, 1647-55.
- McEvoy, M. T. & R. S. Stern (1987) Psoralens and related compounds in the treatment of psoriasis. *Pharmacol Ther*, 34, 75-97.
- McMillian, M. K., L. Li, J. B. Parker, L. Patel, Z. Zhong, J. W. Gunnett, W. J. Powers & M. D. Johnson (2002) An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biol Toxicol*, 18, 157-73.
- Michael, G. 1999. *Biochemical Pathways*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Miyata, M., H. Takano, L. Q. Guo, K. Nagata & Y. Yamazoe (2004) Grapefruit juice intake does not enhance but rather protects against aflatoxin B1-induced liver DNA damage through a reduction in hepatic CYP3A activity. *Carcinogenesis*, 25, 203-9.
- Möller, M., H. Stopper, M. Haring, Y. Schleger, B. Epe, W. Adam & C. R. Saha-Moller (1995) Genotoxicity induced by furocoumarin hydroperoxides in mammalian cells upon UVA irradiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 216, 693-701.
- Monbaliu, J. G., F. M. Belpaire & M. G. Bogaert (1988a) Study of the bioavailability of different formulations of 8-methoxypsoralen in the dog. *Biopharm Drug Dispos*, 9, 1-8.
- Monbaliu, J. G., F. M. Belpaire, R. A. Braeckman & M. G. Bogaert (1988b) Pharmacokinetics of 8-methoxypsoralen in the dog. *Biopharm Drug Dispos*, 9, 9-17.
- Moore, D. E. & J. Wang (1998) Electron-transfer mechanisms in photosensitization by the anti-inflammatory drug benzydamine. *J Photochem Photobiol B*, 43, 175-80.
- Morgan, A. R., J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, N. L. Murray & D. H. Evans (1979) Review: ethidium fluorescence assays. Part 1. Physicochemical studies. *Nucleic Acids Res*, 7, 547-69.
- Mori, M., H. Kobayashi, Y. Katsumura & C. Furihata (2001) Induction of unscheduled DNA synthesis in hairless mouse epidermis by 8-methoxypsoralen plus ultraviolet A (PUVA). *J Toxicol Sci*, 26, 1-8.
- Morita, A., T. Werfel, H. Stege, C. Ahrens, K. Karmann, M. Grewe, S. Grether-Beck, T. Ruzicka, A. Kapp, L. O. Klotz, H. Sies & J. Krutmann (1997) Evidence that singlet

- oxygen-induced human T helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation phototherapy. *J Exp Med*, 186, 1763-8.
- Morliere, P., H. Honigsmann, D. Averbeck, M. Dardalhon, G. Huppe, B. Ortel, R. Santus & L. Dubertret (1988) Phototherapeutic, photobiologic, and photosensitizing properties of khellin. *J Invest Dermatol*, 90, 720-4.
- Moseley, H., M. Davison & R. M. MacKie (1983) Measurement of daylight UVA in Glasgow. *Phys Med Biol*, 28, 589-97.
- Möseneder, J. 2006. Riboflavin. In *Römpp Lexikon der Lebensmittelchemie*, eds. G. Eisenbrand & P. Schreier. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Mullen, M. P., M. A. Pathak, J. D. West, T. J. Harrist & F. Dall'Acqua. 1982. Carcinogenic Effects of Monofunctional and Bifunctional Furocoumarins. In *Conference on Photobiologic, Toxicologic and Pharmacologic Aspects of Psoralens*. Research Triangle Park, North Carolina.
- Müller, L. & P. Kasper (1998) The relevance of photomutagenicity testing as a predictor of photocarcinogenicity. *International Journal of Toxicology*, 17, 551-558.
- Müller, L., P. Kasper, B. Kersten & J. Zhang (1998) Photochemical genotoxicity and photochemical carcinogenesis--two sides of a coin? *Toxicol Lett*, 102-103, 383-7.
- Musajo, L. & G. Rodighiero (1962) The skin-photosensitizing furocoumarins. *Experientia*, 18, 153-61.
- (1970) Studies on the photo-C4-cyclo-addition reactions between skin-photosensitizing furocoumarins and nucleic acids. *Photochem Photobiol*, 11, 27-35.
- (1972) Mode of photosensitizing action of furocoumarins. *Photophysiology*, 115-47.
- Musajo, L., G. Rodighiero, G. Colombo, V. Torlone & F. Dallacqua (1965) Photosensitizing Furocoumarins: Interaction with DNA and Photo-Inactivation of DNA Containing Viruses. *Experientia*, 21, 22-4.
- Myung, K., J. A. Narciso & J. A. Manthey (2008) Removal of furanocoumarins in grapefruit juice by edible fungi. *J Agric Food Chem*, 56, 12064-8.
- Naganuma, M., S. Hirose, Y. Nakayama, K. Nakajima & T. Someya (1985) A study of the phototoxicity of lemon oil. *Arch Dermatol Res*, 278, 31-6.
- Nakai, H., Y. Yamauchi, A. Nakata, T. Baba & H. Takahashi (2003) Ab initio molecular dynamics study on the excitation dynamics of psoralen compounds. *Journal of Chemical Physics*, 119, 4223-4228.
- Nakayama, G. R., M. C. Caton, M. P. Nova & Z. Parandoosh (1997) Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods*, 204, 205-8.
- Natarajan, A. T., E. A. Verdegaal-Immerzeel, M. J. Ashwood-Smith & G. A. Poulton (1981) Chromosomal damage induced by furocoumarins and UVA in hamster and human cells including cells from patients with ataxia telangiectasia and xeroderma pigmentosum. *Mutat Res*, 84, 113-24.
- Neidle, S. 2007. *Principles of Nucleic Acid Structure* London: Academic Press.
- Neumann, N. J., O. J. Grosse, T. Ruzicka & P. Lehmann (2001) Penetration kinetics of 8-methoxypsoralen after 8-methoxypsoralen bath procedure with and without UVA irradiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14, 210-6.
- Niederberger, E. 1998. Mechanismusorientierte Untersuchungen zur antineoplastischen Wirkung von Naturstoffen und Naturstoffderivaten. In *Biologie*. Kaiserslautern, Deutschland: TU Kaiserslautern.
- Nigg, H. N., H. E. Nordby, R. C. Beier, A. Dillman, C. Macias & R. C. Hansen (1993) Phototoxic coumarins in limes. *Food Chem Toxicol*, 31, 331-5.
- Nijsten, T. E. & R. S. Stern (2002) Genital squamous cell carcinoma in men treated by photochemotherapy. A cancer registry-based study from 1978 to 1998. *Br J Dermatol*, 147, 184-5; author reply 185-6.

- Nocentini, S. (1986) DNA photobinding of 7-methylpyrido[3,4-c]psoralen and 8-methoxypsoralen. Effects on macromolecular synthesis, repair and survival in cultured human cells. *Mutat Res*, 161, 181-92.
- O'Brien, J., I. Wilson, T. Orton & F. Pognan (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 267, 5421-6.
- Obe, G., C. Johannes & D. Schulte-Frohlinde (1992) DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis*, 7, 3-12.
- OECD. 1997a. OECD Guideline for Testing of Chemicals, Guideline 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test.
- . 1997b. OECD Guideline for Testing of Chemicals, *in vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (476).
- . 2004. OECD Guideline for Testing of Chemicals, *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test (432).
- . 2007. OECD Guideline for Testing of Chemicals, Draft Proposal for a new Guideline 487: *in vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (MNvit).
- . 2010. OECD Guideline for Testing of Chemicals, Guideline 487: *in vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (MNvit).
- Oh, H., H. S. Lee, T. Kim, K. Y. Chai, H. T. Chung, T. O. Kwon, J. Y. Jun, O. S. Jeong, Y. C. Kim & Y. G. Yun (2002) Furocoumarins from *Angelica dahurica* with hepatoprotective activity on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Planta Medica*, 68, 463-464.
- Opdyke, D. L. (1973) Monographs on fragrance raw materials. *Food Cosmet Toxicol*, 11, 1011-81.
- Orimo, H., Y. Tokura, R. Hino & H. Kasai (2006) Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the DNA of cultured human keratinocytes by clinically used doses of narrowband and broadband ultraviolet B and psoralen plus ultraviolet A. *Cancer Sci*, 97, 99-105.
- Ortel, B., A. Tanew & H. Honigsmann (1988) Treatment of vitiligo with khellin and ultraviolet A. *J Am Acad Dermatol*, 18, 693-701.
- Oshimura, M. & J. C. Barrett (1986) Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer. *Environ Mutagen*, 8, 129-59.
- Ostertag, E., T. Becker, J. Ammon, H. Bauer-Aymanns & D. Schrenk (2002) Effects of storage conditions on furocoumarin levels in intact, chopped, or homogenized parsnips. *J Agric Food Chem*, 50, 2565-70.
- Ou, C. N., P. S. Song, M. L. Harter & I. C. Felkner (1976) Spectroscopic Properties and Interactions of Dimethoxycoumarin with DNA. *Photochemistry and Photobiology*, 24, 487-490.
- Ou, C. N., C. H. Tsai, K. J. Tapley & P. S. Song (1978) Photobinding of 8-Methoxypsoralen and 5,7-Dimethoxycoumarin to DNA and Its Effect on Template Activity. *Biochemistry*, 17, 1047-1053.
- Pae, H. O., H. Oh, Y. G. Yun, G. S. Oh, S. I. Jang, K. M. Hwang, T. O. Kwon, H. S. Lee & H. T. Chung (2002) Imperatorin, a furanocoumarin from *Angelica dahurica* (Umbelliferae), induces cytochrome c-dependent apoptosis in human promyelocytic leukaemia, HL-60 Cells. *Pharmacology & Toxicology*, 91, 40-8.
- Paine, M. F., A. B. Criss & P. B. Watkins (2005) Two major grapefruit juice components differ in time to onset of intestinal CYP3A4 inhibition. *J Pharmacol Exp Ther*, 312, 1151-60.

- Papadopoulos, D. & D. Averbeck (1985) Genotoxic effects and DNA photoadducts induced in Chinese hamster V79 cells by 5-methoxypsoralen and 8-methoxypsoralen. *Mutat Res*, 151, 281-91.
- Papadopoulos, D., A. Laquerbe, C. Guillouf & E. Moustacchi (1993) Molecular spectrum of mutations induced at the HPRT locus by a cross-linking agent in human cell lines with different repair capacities. *Mutat Res*, 294, 167-77.
- Papadopoulos, D. & E. Moustacchi (1990) Mutagenic effects photoinduced in normal human lymphoblasts by a monofunctional pyridopsoralen in comparison to 8-methoxypsoralen. *Mutat Res*, 245, 259-66.
- Papadopoulos, D., B. Porfirio & E. Moustacchi (1990) Mutagenic response of Fanconi's anemia cells from a defined complementation group after treatment with photoactivated bifunctional psoralens. *Cancer Res*, 50, 3289-94.
- Papadopoulos, D., F. Sagliocco & D. Averbeck (1983) Mutagenic effects of 3-carbethoxypsoralen and 8-methoxypsoralen plus 365-nm irradiation in mammalian cells. *Mutat Res*, 124, 287-97.
- Patel, P. I., P. E. Framson, C. T. Caskey & A. C. Chinault (1986) Fine structure of the human hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Mol Cell Biol*, 6, 393-403.
- Pathak, M. A. & T. B. Fitzpatrick (1992) The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *J Photochem Photobiol B*, 14, 3-22.
- Pathak, M. A. & P. C. Joshi (1984) Production of active oxygen species (1O_2 and $O_2^{.-}$) by psoralens and ultraviolet radiation (320-400 nm). *Biochim Biophys Acta*, 798, 115-26.
- Pathak, S. (1990) Cytogenetic abnormalities in cancer: with special emphasis on tumor heterogeneity. *Cancer Metastasis Rev*, 8, 299-318.
- Paulini, H., U. Eilert & O. Schimmer (1987) Mutagenic compounds in an extract from *rutae herba* (*Ruta graveolens* L.). I. Mutagenicity is partially caused by furoquinoline alkaloids. *Mutagenesis*, 2, 271-3.
- Peckler, S., B. Graves, D. Kanne, H. Rapoport, J. E. Hearst & S. H. Kim (1982) Structure of a psoralen-thymine monoadduct formed in photoreaction with DNA. *J Mol Biol*, 162, 157-72.
- Pegg, D. E. (2007) Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*, 368, 39-57.
- Peritz, A. E. & F. P. Gasparro (1999) Psoriasis, PUVA, and skin cancer--molecular epidemiology: the curious question of T \rightarrow A transversions. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 4, 11-6.
- Philip, P. A., S. Ali-Sadat, J. Doehmer, T. Kocarek, A. Akhtar, H. Lu & K. K. Chan (1999) Use of V79 cells with stably transfected cytochrome P450 cDNAs in studying the metabolism and effects of cytotoxic drugs. *Cancer Chemother Pharmacol*, 43, 59-67.
- PierceBiotechnologyInc. (2005) Pierce® BCA Protein Assay Kit - Instructions.
- Piette, J. (1991) Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen. *J Photochem Photobiol B*, 11, 241-60.
- Piette, J. G. & J. E. Hearst (1983) Termination sites of the in vitro nick-translation reaction on DNA that had photoreacted with psoralen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 5540-4.
- Pösch, G., P. Dittrich & S. Holzmann (1990) Evaluation of combined effects in dose-response studies by statistical comparison with additive and independent interactions. *J Pharmacol Methods*, 24, 311-25.
- Pösch, G. & S. Holzmann (1980) Quantitative estimation of overadditive and underadditive drug effects by means of theoretical, additive dose-response curves. *J Pharmacol Methods*, 4, 179-88.

- Pokharel, Y. R., E. H. Han, J. Y. Kim, S. J. Oh, S. K. Kim, E. R. Woo, H. G. Jeong & K. W. Kang (2006) Potent protective effect of isoimperatorin against aflatoxin B1-inducible cytotoxicity in H4IIE cells: bifunctional effects on glutathione S-transferase and CYP1A. *Carcinogenesis*, 27, 2483-90.
- Pool, B. L., R. Klein & R. P. Deutsch-Wenzel (1982) Genotoxicity of 5-methoxypsoralen and near ultraviolet light in repair-deficient strains of Escherichia coli WP2. *Food Chem Toxicol*, 20, 177-81.
- Poot, M., K. H. Hiller, S. Heimpel & H. Hoehn (1995) Distinct patterns of cell cycle disturbance elicited by compounds interfering with DNA topoisomerase I and II activity. *Exp Cell Res*, 218, 326-30.
- Poot, M., K. Kausch, J. Kohler, T. Haaf & H. Hoehn (1990) The minor-groove binding DNA-ligands netropsin, distamycin A and berenil cause polyploidisation via impairment of the G2 phase of the cell cycle. *Cell Struct Funct*, 15, 151-7.
- Potapenko, A. (1991) Mechanisms of photodynamic effects of furocoumarins. *J Photochem Photobiol B*, 9, 1-33.
- Prasad, K. N., J. Hao, C. Yi, D. Zhang, S. Qiu, Y. Jiang, M. Zhang & F. Chen (2009) Antioxidant and anticancer activities of wampee (Clausena lansium (Lour.) Skeels) peel. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 612805.
- Price, P. S., R. B. Conolly, C. F. Chaisson, E. A. Gross, J. S. Young, E. T. Mathis & D. R. Tedder (2003) Modeling interindividual variation in physiological factors used in PBPK models of humans. *Critical Reviews in Toxicology*, 33, 469-503.
- Quinto, I., D. Averbeck, E. Moustacchi, Z. Hrisoho & J. Moron (1984) Frameshift mutagenicity in Salmonella typhimurium of furocoumarins in the dark. *Mutat Res*, 136, 49-54.
- Ramaswamy, S. (1975) Psoralens in Foods. *Indian Food Packer*, 29, 37-46.
- Raquet, N. 2007. Diplomarbeit: Bestandteile des Sellerie- und Grapefruitsafts als Modulatoren des Fremdstoffmetabolismus. In *Lebensmittelchemie&Umwelttoxikologie*. Kaiserslautern, Germany: TU Kaiserslautern.
- Raquet, N. & D. Schrenk (2009) Relative photomutagenicity of furocoumarins and limettin in the hypoxanthine phosphoribosyl transferase assay in V79 cells. *Chem Res Toxicol*, 22, 1639-47.
- REACH-VO. 2006. Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission. ed. E. Union.
- Redinbaugh, M. G. & W. H. Campbell (1985) Adaptation of the dye-binding protein assay to microtiter plates. *Anal Biochem*, 147, 144-7.
- Reffstrup, T. K., J. C. Larsen & O. Meyer (2010) Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regul Toxicol Pharmacol*, 56, 174-92.
- Reichl, F. X. & M. Schwenk. 2004. *Regulatorische Toxikologie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Reinhardt, C. G. & T. R. Krugh (1978) A comparative study of ethidium bromide complexes with dinucleotides and DNA: direct evidence for intercalation and nucleic acid sequence preferences. *Biochemistry*, 17, 4845-54.

- Riccio, M. L., G. Coratza, L. Bovalini & P. Martelli (1992) Investigation of the mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* of the furochromone khellin, proposed as a therapeutic agent for skin diseases. *Mutat Res*, 279, 103-8.
- Robertson, A. B., A. Klungland, T. Rognes & I. Leiros (2009) DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci*, 66, 981-93.
- Rocha, M. S., N. B. Viana & O. N. Mesquita (2004) DNA-psoralen interaction: a single molecule experiment. *J Chem Phys*, 121, 9679-83.
- Rochette, P. J., J. P. Therrien, R. Drouin, D. Perdiz, N. Bastien, E. A. Drobetsky & E. Sage (2003) UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic Acids Res*, 31, 2786-94.
- Rodighiero, G., L. Musajo, F. Dall'Acqua, S. Marciani, G. Caporale & L. Ciavatta (1970) Mechanism of Skin Photosensitisation by Furocoumarins - Photoreactivity of Various Furocoumarins with native DNA and with Ribosomal DNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 217, 40-49.
- Rodighiero, G., L. Musajo, F. Dall'Acqua, S. Marciani, G. Caporale & M. L. Ciavatta (1969) A comparison between the photoreactivity of some furocoumarins with native DNA and their skin-photosensitizing activity. *Experientia*, 25, 479-81.
- Roelandts, R., M. Van Boven, P. Adriaens, F. De Schryver & H. Degreef (1983) The relationship between 8-methoxypsoralen skin and blood levels. *J Invest Dermatol*, 81, 331-3.
- Roelants, M., B. Lackner, M. Waser, H. Falk, P. Agostinis, H. Van Poppel & P. A. de Witte (2009) In vitro study of the photocytotoxicity of bathochromically-shifted hypericin derivatives. *Photochem Photobiol Sci*, 8, 822-9.
- Romagna, F. 1993. Mikrokerntestsyste. In *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, ed. R. Fahrig. Darmstadt: wissenschaftliche Buchgesellschaft.
- Row, E. C., S. A. Brown, A. V. Stachulski & M. S. Lennard (2006) Design, synthesis and evaluation of furanocoumarin monomers as inhibitors of CYP3A4. *Org Biomol Chem*, 4, 1604-10.
- Roza, L., G. P. van der Schans & P. H. Lohman (1985) The induction and repair of DNA damage and its influence on cell death in primary human fibroblasts exposed to UV-A or UV-C irradiation. *Mutat Res*, 146, 89-98.
- Saenz-Méndez, P., R. C. Guedes, D. J. V. A. d. Santos & L. A. Eriksson (2007) Theoretical Study of Sequence Selectivity and Preferred Binding Mode of Psoralen with DNA. *Research Letters in Physical Chemistry*, 2007.
- Safe, S. H. (1998) Hazard and risk assessment of chemical mixtures using the toxic equivalency factor approach. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 4, 1051-8.
- Saffran, W. A., M. Goldenberg & C. R. Cantor (1982) Site-directed psoralen crosslinking of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 4594-8.
- Sage, E. & A. Bredberg (1991) Damage distribution and mutation spectrum: the case of 8-methoxypsoralen plus UVA in mammalian cells. *Mutat Res*, 263, 217-22.
- Sage, E., E. A. Drobetsky & E. Moustacchi (1993) 8-Methoxypsoralen induced mutations are highly targeted at crosslinkable sites of photoaddition on the non-transcribed strand of a mammalian chromosomal gene. *EMBO J*, 12, 397-402.
- Sage, E., T. Le Doan, V. Boyer, D. E. Helland, L. Kittler, C. Helene & E. Moustacchi (1989) Oxidative DNA damage photo-induced by 3-carbethoxypsoralen and other furocoumarins. Mechanisms of photo-oxidation and recognition by repair enzymes. *J Mol Biol*, 209, 297-314.
- Sage, E. & E. Moustacchi (1987) Sequence context effects on 8-methoxypsoralen photobinding to defined DNA fragments. *Biochemistry*, 26, 3307-14.

- Said, A., S. Makki, P. Muret, P. Humbert & J. Millet (1997) Psoralens percutaneous permeation across the human whole skin and the epidermis in respect to their polarity (in vitro study). *J Dermatol Sci*, 14, 136-44.
- Santana, L., E. Uriarte, L. Dalla Via & O. Gia (2000) A new benzoangelicin with strong photobiological activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10, 135-7.
- Sayre, R. M. & J. C. Dowdy (2008) The increase in melanoma: Are dietary furocoumarins responsible? *Medical Hypotheses*, 70, 855-859.
- Schärer, O. D. (2003) Chemie und Biologie der DNA-Reparatur. *Angew Chem*, 115, 3052-3082.
- Schiebel, E. (2000) gamma-tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 113-8.
- Schimmer, O. (1981) [Comparison of photomutagenic activities of 5-mop (bergapten) and 8-mop (xanthotoxin) in *Chlamydomonas reinhardtii* (author's transl)]. *Mutat Res*, 89, 283-96.
- (1997) Studies on the photobiological activity of two naturally occurring furochromones, visnagin and khellin, in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mutagenesis*, 12, 141-145.
- Schimmer, O. & G. Abel (1986) Mutagenicity of a furocoumarin epoxide, heraclenin, in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mutat Res*, 169, 47-50.
- Schimmer, O., R. Beck & U. Dietz (1980) Phototoxicity and photomutagenicity of furocoumarins and furocoumarin drugs in *Chlamydomonas reinhardtii*. Comparison of biological activities as a basis of risk evaluation. *Planta Medica*, 40, 68-76.
- Schimmer, O., J. Kiefer & H. Paulini (1991) Inhibitory effects of furocoumarins in *Salmonella typhimurium* TA98 on the mutagenicity of dictamnine and rutacridone, promutagens from *Ruta graveolens* L. *Mutagenesis*, 6, 501-6.
- Schimmer, O. & I. Kühne (1990) Mutagenic compounds in an extract from *Rutae Herba* (*Ruta graveolens* L.). II. UV-A mediated mutagenicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by furoquinoline alkaloids and furocoumarins present in a commercial tincture from *Rutae Herba*. *Mutat Res*, 243, 57-62.
- Schlatter, J. (1988) Die toxikologische Bedeutung von Furocoumarinen in pflanzlichen Lebensmitteln. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hygiene*, 79, 130-143.
- Schlatter, J., B. Zimmerli, R. Dick, R. Panizzon & C. Schlatter (1991) Dietary-Intake and Risk Assessment of Phototoxic Furocoumarins in Humans. *Food and Chemical Toxicology*, 29, 523-530.
- Schmid, J., A. Prox, A. Reuter, H. Zipp & F. W. Koss (1980a) The metabolism of 8-methoxypsoralen in man. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 5, 81-92.
- Schmid, J., A. Prox, H. Zipp & F. W. Koss (1980b) The use of stable isotopes to prove the saturable first-pass effect of methoxsalen. *Biomed Mass Spectrom*, 7, 560-4.
- Schmitt, I. M., S. Chimenti & F. P. Gasparro (1995) Psoralen-protein photochemistry--a forgotten field. *J Photochem Photobiol B*, 27, 101-7.
- Schmitt, I. M., V. M. Maxwell, G. A. Olack, R. L. Edelson, S. Chimenti & F. P. Gasparro (1994) The specific effects of 8-methoxypsoralen photoadducts on cell growth: HPLC analysis of monoadduct and crosslink formation in cells exposed to split-dose treatment. *J Photochem Photobiol B*, 22, 17-21.
- Schoonderwoerd, S. A., G. M. Beijersbergen van Henegouwen, C. C. Persons, S. Caffieri & F. Dall'Acqua (1991) Photobinding of 8-methoxypsoralen, 4,6,4'-trimethylangelicin and chlorpromazine to Wistar rat epidermal biomacromolecules in vivo. *J Photochem Photobiol B*, 10, 257-68.
- Schumacher, D. 2005. Untersuchungen zur genotoxischen und mutagenen Wirkung des Mykotoxins Patulin. In *Fakultät für Chemie und Biowissenschaften*. Karlsruhe, Deutschland: Universität Karlsruhe (TH).

- Scott, B. R., M. A. Pathak & G. R. Mohn (1976) Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions. *Mutat Res*, 39, 29-74.
- Seidl, H., H. Kreimer-Erlacher, B. Back, H. P. Soyer, G. Hofler, H. Kerl & P. Wolf (2001) Ultraviolet exposure as the main initiator of p53 mutations in basal cell carcinomas from psoralen and ultraviolet A-treated patients with psoriasis. *J Invest Dermatol*, 117, 365-70.
- Serotec. 2003. Serotec Product Datasheet ALAMARBLUE™.
- Serrano-Perez, J. J., R. Gonzalez-Luque, M. Merchan & L. Serrano-Andres (2008a) The family of furocoumarins: Looking for the best photosensitizer for phototherapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 199, 34-41.
- Serrano-Perez, J. J., M. Merchan & L. Serrano-Andres (2008b) Photoreactivity of furocoumarins and DNA in PUVA therapy: formation of psoralen-thymine adducts. *J Phys Chem B*, 112, 14002-10.
- Serrano-Perez, J. J., L. Serrano-Andres & M. Merchan (2008c) Photosensitization and phototherapy with furocoumarins: A quantum-chemical study. *Chemical Physics*, 347, 422-435.
- Sexton, K. & D. Hattis (2007) Assessing cumulative health risks from exposure to environmental mixtures - three fundamental questions. *Environ Health Perspect*, 115, 825-32.
- Sheehan, J. M. & A. R. Young (2002) The sunburn cell revisited: an update on mechanistic aspects. *Photochem Photobiol Sci*, 1, 365-77.
- Shephard, S. E., P. Langguth & R. G. Panizzon (2001) Pharmacokinetic behaviour of sublingually administered 8-methoxypsoralen for PUVA therapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 17, 11-21.
- Shim, S. C., H. K. Kang, S. K. Park & E. J. Shin (1987) Photophysical Properties of Some Coumarin Derivatives - 5,7-Dimethoxycoumarin, 4',5'-Dihydropsoresalen, 8-Methoxypsoralen (8-Mop) and 8-Mop(4',5'-5',6)Thymidine C4-Cyclomonoadduct. *Journal of Photochemistry*, 37, 125-137.
- Shin, K. H., M. S. Chung & T. S. Cho (1994) Effects of Furanocoumarins from *Angelica Dahurica* on Aldose Reductase and Galactosemic Cataract Formation in Rats. *Arch. Pharm. Res*, 17, 331-336.
- Shin, K. H., S. W. Woo, K. H. Moon & S. J. Yoo (1993) Effects of Naturally Occurring Furanocoumarins on Lipid Peroxidation and Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Mice. *Arch. Pharm. Res*, 15, 13-17.
- Siddhuraju, P., P. S. Mohan & K. Becker (2002) Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chemistry*, 79, 61-67.
- Sies, H. & C. F. Menck (1992) Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res*, 275, 367-75.
- Sigma-Aldrich. 2002. Product Information: Deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus (D 1501). saint Louis, Missouri, USA.
- Simmons, J. E. & C. Gennings (1996) Experimental designs, statistics and interpretation. *Food Chem Toxicol*, 34, 1169-71.
- SKLM. 2006. Toxicological Assessment of Furocoumarins in Foodstuffs. Kaiserslautern, Germany: (DFG - Senate Commission on Food Safety) Eisenbrand, G.
- . 2010. Aktualisierung der toxikologischen Beurteilung von Furocoumarinen in Lebensmitteln. Kaiserslautern, Germany: (DFG - Senate Commission on Food Safety) Eisenbrand, G.
- Smerhovsky, Z., K. Landa, P. Rossner, D. Juzova, M. Brabec, Z. Zudova, N. Hola, H. Zarska & E. Nevsimalova (2002) Increased risk of cancer in radon-exposed miners with elevated frequency of chromosomal aberrations. *Mutat Res*, 514, 165-76.

- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson & D. C. Klenk (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- Song, P. S., W. W. Mantulin, D. McInturff, I. C. Felkner & M. L. Harter (1975) Photoreactivity of hydroxypsoralens and their photobiological effects in *Bacillus subtilis*. *Photochem Photobiol*, 21, 317-24.
- Song, P. S. & K. J. Tapley (1979) Photochemistry and Photobiology of Psoralens. *Photochemistry and Photobiology*, 29, 1177-1197.
- Spielmann, H., M. Balls, M. Brand, B. Doring, H. G. Holzhutter, S. Kalweit, G. Klecak, H. L. Eplattenier, M. Liebsch, W. W. Lovell, T. Maurer, F. Moldenhauer, L. Moore, W. J. Pape, U. Pfannenbecker, J. Potthast, O. De Silva, W. Steiling & A. Willshaw (1994) EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicol In Vitro*, 8, 793-6.
- Spielmann, H., L. Muller, D. Aeverbeck, M. Balls, S. Brendler-Schwaab, J. V. Castell, R. Curren, O. de Silva, N. K. Gibbs, M. Liebsch, W. W. Lovell, H. F. Merk, J. F. Nash, N. J. Neumann, W. J. Pape, P. Ulrich & H. W. Vohr (2000) The second ECVAM workshop on phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 42. *Altern Lab Anim*, 28, 777-814.
- Stanjek, V., M. Miksch & W. Boland (1997) Stereoselective syntheses of deuterium labelled marmesins; Valuable metabolic probes for mechanistic studies in furanocoumarin biosynthesis. *Tetrahedron*, 53, 17699-17710.
- Stanjek, V., M. Miksch, P. Lueer, U. Matern & W. Boland (1999a) Biosynthesis of psoralen: Mechanism of a cytochrome p450 catalyzed oxidative bond cleavage. *Angewandte Chemie-International Edition*, 38, 400-402.
- Stanjek, V., J. Piel & W. Boland (1999b) Synthesis of furanocoumarins: mevalonate-independent prenylation of umbelliferone in *Apium graveolens* (Apiaceae). *Phytochemistry*, 50, 1141-1145.
- Stanley, W. L. & s. h. Vannier (1967) Psoralens and substituted coumarins from expressed oil of lime. *Phytochemistry*, 6, 585-596.
- SteigerwaldArzneimittelwerke. 2007. Furocoumarine in *Angelica Archangelica*. Darmstadt.
- Steinhoff, B. 2007. Expert Meeting on Furocoumarins - Background and Regulatory Aspects. In *Furocoumarins in Phytomedicines - Is there a Relevant Risk?* Technische Universität Kaiserslautern, Germany.
- Stern, R. S. (1998) Photocarcinogenicity of drugs. *Toxicol Lett*, 102-103, 389-92.
- (2001) The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *J Am Acad Dermatol*, 44, 755-61.
- Stern, R. S., S. Bagheri & K. Nichols (2002) The persistent risk of genital tumors among men treated with psoralen plus ultraviolet A (PUVA) for psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, 47, 33-9.
- Stern, R. S., E. J. Liebman & L. Vakeva (1998) Oral psoralen and ultraviolet-A light (PUVA) treatment of psoriasis and persistent risk of nonmelanoma skin cancer. PUVA Follow-up Study. *J Natl Cancer Inst*, 90, 1278-84.
- Stivala, L. A., R. Pizzala, R. Rossi, R. Melli, M. G. Verri & L. Bianchi (1995) Photoinduction of micronuclei by 4,4',6-trimethylangelicin and 8-methoxypsoralen in different experimental models. *Mutat Res*, 327, 227-36.
- Stolk, L. M. & A. H. Siddiqui (1988) Biopharmaceutics, pharmacokinetics and pharmacology of psoralens. *Gen Pharmacol*, 19, 649-53.
- Stolk, L. M., A. H. Siddiqui, W. Westerhof & R. H. Cormane (1985) Comparison of bioavailability and phototoxicity of two oral preparations of 5-methoxypsoralen. *Br J Dermatol*, 112, 469-73.

- Stout, J. T. & C. T. Caskey (1985) HPRT: gene structure, expression, and mutation. *Annu Rev Genet*, 19, 127-48.
- Struwe, M., K. O. Greulich, W. Suter & U. Plappert-Helbig (2007) The photo comet assay-a fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro. *Mutat Res*, 632, 44-57.
- Svoboda, D. L., J. S. Taylor, J. E. Hearst & A. Sancar (1993) DNA repair by eukaryotic nucleotide excision nuclease. Removal of thymine dimer and psoralen monoadduct by HeLa cell-free extract and of thymine dimer by *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem*, 268, 1931-6.
- Svobodova, A., D. Walterova & J. Vostalova (2006) Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 150, 25-38.
- Takeuchi, T., S. Matsugo & K. Morimoto (1997) Mutagenicity of oxidative DNA damage in Chinese hamster V79 cells. *Carcinogenesis*, 18, 2051-5.
- Tallarida, R. J. (2006) An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J Pharmacol Exp Ther*, 319, 1-7.
- Tamaro, M., S. Gastaldi, F. Carlassare, N. Babudri & B. Pani (1986) Genotoxic activity of some water-soluble derivatives of 5-methoxypsoralen and 8-methoxypsoralen. *Carcinogenesis*, 7, 605-9.
- Tassaneeyakul, W., L. Q. Guo, K. Fukuda, T. Ohta & Y. Yamazoe (2000) Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. *Arch Biochem Biophys*, 378, 356-63.
- Tawar, U., A. K. Jain, R. Chandra, Y. Singh, B. S. Dwarakanath, N. K. Chaudhury, L. Good & V. Tandon (2003) Minor groove binding DNA ligands with expanded A/T sequence length recognition, selective binding to bent DNA regions and enhanced fluorescent properties. *Biochemistry*, 42, 13339-46.
- Teng, M. K., N. Usman, C. A. Frederick & A. H. Wang (1988) The molecular structure of the complex of Hoechst 33258 and the DNA dodecamer d(CGCGAATTCGCG). *Nucleic Acids Res*, 16, 2671-90.
- Termini, J. (2000) Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations. *Mutat Res*, 450, 107-24.
- Tessman, J. W., S. T. Isaacs & J. E. Hearst (1985) Photochemistry of the furan-side 8-methoxypsoralen-thymidine monoadduct inside the DNA helix. Conversion to diadduct and to pyrone-side monoadduct. *Biochemistry*, 24, 1669-76.
- Teuschler, L. K. & R. C. Hertzberg (1995) Current and future risk assessment guidelines, policy, and methods development for chemical mixtures. *Toxicology*, 105, 137-44.
- Thieden, E., P. A. Philipsen, J. Sandby-Moller & H. C. Wulf (2005a) Sunburn related to UV radiation exposure, age, sex, occupation, and sun bed use based on time-stamped personal dosimetry and sun behavior diaries. *Arch Dermatol*, 141, 482-8.
- (2005b) Sunscreen use related to UV exposure, age, sex, and occupation based on personal dosimeter readings and sun-exposure behavior diaries. *Arch Dermatol*, 141, 967-73.
- Thielen, S. 2007. Charakterisierung DNA-schädigender Wirkungen mittels Comet Assay und hPRT-Genmutations-Assay: Ein Vergleich zwischen a,b-ungesättigten Carbonylverbindungen, Epoxiden und N-Nitroso-verbindungen (D386). In *Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie*. Kaiserslautern, Deutschland: TU Kaiserslautern.
- Trabalzini, L., P. Martelli, L. Bovalini, F. Dall'Acqua & E. Sage (1990) Photosensitization of DNA of defined sequence by furochromones, khellin and visnagin. *J Photochem Photobiol B*, 7, 317-36.

- Tuveson, R. W., M. R. Berenbaum & E. E. Heininger (1986) Inactivation and Mutagenesis by Phototoxins Using Escherichia-Coli Strains Differing in Sensitivity to near-Ultraviolet and Far-Ultraviolet Light. *Journal of Chemical Ecology*, 12, 933-948.
- Ueda, K. & T. Komano (1984) Sequence-specific DNA damage induced by reduced mitomycin C and 7-N-(p-hydroxyphenyl)mitomycin C. *Nucleic Acids Res*, 12, 6673-83.
- Uesawa, Y. & K. Mohri (2006a) The use of heat treatment to eliminate drug interactions due to grapefruit juice. *Biol Pharm Bull*, 29, 2274-8.
- (2006b) UV-irradiated grapefruit juice loses pharmacokinetic interaction with nifedipine in rats. *Biol Pharm Bull*, 29, 1286-9.
- US-EPA. 1986. Guidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures. ed. U. S. E. P. Agency. Washington, DC.
- . 2000. Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures. ed. U. S. E. P. Agency. Washington, DC.
- . 2006. Organophosphate Cumulative Risk Assessment. ed. U. S. E. P. Agency. Washington, DC.
- Uwaifo, A. O., P. C. Billings & C. Heidelberger (1983) Mutation of Chinese Hamster V79 cells and transformation and mutation of mouse fibroblast C3H/10T1/2 clone 8 cells by aflatoxin B1 and four other furocoumarins isolated from two Nigerian medicinal plants. *Cancer Res*, 43, 1054-8.
- van Driel, R., P. F. Fransz & P. J. Verschure (2003) The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci*, 116, 4067-75.
- van Iperen, H. P. & G. M. Beijersbergen van Henegouwen (1997) Clinical and mechanistic aspects of photopheresis. *J Photochem Photobiol B*, 39, 99-109.
- Van Zeeland, A. A., G. R. Mohn, L. H. Mullenders, A. T. Natarajan, M. Nivard, J. W. Simons, J. Venema, E. W. Vogel, H. Vrieling, M. Z. Zdzienicka & et al. (1989) Relationship between DNA-adduct formation, DNA repair, mutation frequency and mutation spectra. *Ann Ist Super Sanita*, 25, 223-8.
- Vanderkerken, K., P. Vanparys, L. Verschaeve & M. Kirsch-Volders (1989) The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis*, 4, 6-11.
- Vantieghem, A., Y. Xu, Z. Assefa, J. Piette, J. R. Vandenheede, W. Merlevede, P. A. M. de Witte & P. Agostinis (2002) Phosphorylation of Bcl-2 in G(2)/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 37718-37731.
- Varga, J. M., G. Wiesehahn, J. C. Bartholomew & J. E. Hearst (1982) Dose-related effects of psoralen and ultraviolet light on the cell cycle of murine melanoma cells. *Cancer Res*, 42, 2223-6.
- Venturini, S., M. Tamaro, C. Monti-Bragadin & F. Carlassare (1981) Mutagenicity in Salmonella typhimurium of some angelicin derivatives proposed as new monofunctional agents for the photochemotherapy of psoriasis. *Mutat Res*, 88, 17-22.
- Vig, B. K. & S. E. Swearngin (1986) Sequence of centromere separation: kinetochore formation in induced laggards and micronuclei. *Mutagenesis*, 1, 461-5.
- Viola, G., L. Facciolo, D. Vedaldi, S. Disaro, G. Basso & F. Dall'Acqua (2004) Differential response of linear and angular psoralens in PUVA-induced apoptosis in HL-60 cells. *Photochem Photobiol Sci*, 3, 237-9.
- Viola, G., A. Salvador, D. Vedaldi, F. Dall'Acqua, N. Bianchi, C. Zuccato, M. Borgatti, I. Lampronti & R. Gambari (2009) Differentiation and Apoptosis in UVA-Irradiated

- Cells Treated with Furocoumarin Derivatives. *Natural Compounds and Their Role in Apoptotic Cell Signaling Pathways*, 1171, 334-344.
- von der Hude, W., S. Kalweit, G. Engelhardt, S. McKiernan, P. Kasper, R. Slacik-Erben, H. G. Miltenburger, N. Honarvar, R. Fahrig, B. Gorlitz, S. Albertini, S. Kirchner, D. Utesch, F. Potter-Locher, H. Stopper & S. Madle (2000) In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances. *Mutat Res*, 468, 137-63.
- Wagstaff, D. J. (1991) Dietary exposure to furocoumarins. *Regul Toxicol Pharmacol*, 14, 261-72.
- Waldman, T., K. W. Kinzler & B. Vogelstein (1995) p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*, 55, 5187-90.
- Wang, Y. (2008) Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol*, 21, 276-81.
- Wangensteen, H., E. Molden, H. Christensen & K. E. Malterud (2003) Identification of epoxybergamottin as a CYP3A4 inhibitor in grapefruit peel. *Eur J Clin Pharmacol*, 58, 663-8.
- Weber, I. C., C. P. Davis & D. M. Greeson (1999) Phytophotodermatitis: the other "lime" disease. *J Emerg Med*, 17, 235-7.
- Wedler, G. 1997. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. Weinheim, Deutschland: WILEY-VCH Verlag GmbH.
- Wiechelmann, K. J., R. D. Braun & J. D. Fitzpatrick (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*, 175, 231-7.
- Wilkinson, C. F., G. R. Christoph, E. Julien, J. M. Kelley, J. Kronenberg, J. McCarthy & R. Reiss (2000) Assessing the risks of exposures to multiple chemicals with a common mechanism of toxicity: how to cumulate? *Regul Toxicol Pharmacol*, 31, 30-43.
- Wink, M. 1999. *Biochemistry of plant secondary metabolism*. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press.
- Winter, C. K. & S. F. Davis (2006) Organic foods. *Journal of Food Science*, 71, R117-R124.
- Winterhoff, H. 2007. Phototoxicity risk assessment of furocoumarins - a survey. In *Furocoumarins in Phytomedicines - is there a relevant risk?* TU Kaiserslautern, Deutschland.
- Wolf, D. 2006. Risikobewertung. In *Römpp Lexikon der Lebensmittelchemie*, eds. G. Eisenbrand & P. Schreier. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Wolf, P., H. Kreimer-Erlacher, H. Seidl, B. Back, H. P. Soyer & H. Kerl (2004) The ultraviolet fingerprint dominates the mutational spectrum of the p53 and Ha-ras genes in psoralen + ultraviolet A keratoses from psoriasis patients. *J Invest Dermatol*, 122, 190-200.
- Wollensak, G., E. Sporl & T. Seiler (2003) [Treatment of keratoconus by collagen cross linking]. *Ophthalmologe*, 100, 44-9.
- Wu, J. H., J. B. Wilson, A. M. Wolfreys, A. Scott & N. J. Jones (2009) Optimization of the comet assay for the sensitive detection of PUVA-induced DNA interstrand cross-links. *Mutagenesis*, 24, 173-81.
- Wulf, H. C. 1982. Aspects of the Toxicology of 8-Methoxypsoralen and Longwave Ultraviolet Light. In *Department of Dermatology, Finsen Institute*. Copenhagen, Denmark: University of Copenhagen.
- Wulff, H., H. Rauer, T. During, C. Hanselmann, K. Ruff, A. Wrisch, S. Grissmer & W. Hansel (1998) Alkoxypsoralens, novel nonpeptide blockers of Shaker-type K⁺ channels: synthesis and photoreactivity. *J Med Chem*, 41, 4542-9.

- Würgler, F. E. 1993. Genetische Endpunkte. In *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, ed. R. Fahrig. Darmstadt: wissenschaftliche Buchgesellschaft.
- Wyllie, A. H. (1992) Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev*, 11, 95-103.
- Wyman, C. & R. Kanaar (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet*, 40, 363-83.
- Xiao, C., Z. G. Song & Z. Q. Liu (2010) Synthesis of methyl-substituted xanthotoxol to clarify prooxidant effect of methyl on radical-induced oxidation of DNA. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 2559-2566.
- Yamamoto, K. I. & Y. Kikuchi (1980) A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res*, 71, 127-31.
- Yarosh, D. B. (1985) The role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in cell survival, mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*, 145, 1-16.
- Yost, G. S., F. R. Stermitz & M. C. Williams (1977) Toxic Furocoumarins of *Cymopterus-Longipes*. *Phytochemistry*, 16, 1097-1097.
- Young, A. R. (1997) Chromophores in human skin. *Phys Med Biol*, 42, 789-802.
- (2004) Tanning devices--fast track to skin cancer? *Pigment Cell Res*, 17, 2-9.
- Young, A. R., I. A. Magnus, A. C. Davies & N. P. Smith (1983) A comparison of the phototumorigenic potential of 8-MOP and 5-MOP in hairless albino mice exposed to solar simulated radiation. *Br J Dermatol*, 108, 507-18.
- Young, A. R., C. S. Potten, C. A. Chadwick, G. M. Murphy, J. L. Hawk & A. J. Cohen (1991) Photoprotection and 5-MOP photochemoprotection from UVR-induced DNA damage in humans: the role of skin type. *J Invest Dermatol*, 97, 942-8.
- Youssefi, A. A., R. Arutyunyan & I. Emerit (1994) Chromosome damage in PUVA-treated human lymphocytes is related to active oxygen species and clastogenic factors. *Mutat Res*, 309, 185-91.
- Yurkow, E. J. & J. D. Laskin (1991) Mechanism of action of psoralens: isobologram analysis reveals that ultraviolet light potentiation of psoralen action is not additive but synergistic. *Cancer Chemother Pharmacol*, 27, 315-9.
- Zajdela, F. & E. Bisagni (1981) 5-Methoxypsoralen, the melanogenic additive in sun-tan preparations, is tumorigenic in mice exposed to 365 nm u.v. radiation. *Carcinogenesis*, 2, 121-7.
- Zankl, H. 1999. Der Mikronukleus-Test in der Mutagenitätsforschung. In *25 Jahre Humangenetik im Saarland*, eds. K. Zang & W. Henn. St. Ingbert: Röhrig Universitätsverlag.
- Zarebska, Z. (1994) Cell membrane, a target for PUVA therapy. *J Photochem Photobiol B*, 23, 101-9.
- Zarebska, Z., E. Waszkowska, S. Caffieri & F. Dall'Acqua (1998) Photoreactions of psoralens with lecithins. *J Photochem Photobiol B*, 45, 122-30.
- Zaynoun, S. T., B. E. Johnson & W. Frain-Bell (1977) A study of oil of bergamot and its importance as a phototoxic agent. I. Characterization and quantification of the photoactive component. *Br J Dermatol*, 96, 475-82.
- Zhou, B. B. & S. J. Elledge (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408, 433-9.
- Zimmer, C., G. Luck & R. Nuske (1980) Protection of (dA.dT) cluster regions in the DNAase I cleavage of DNA by specific interaction with netropsin. *Nucleic Acids Res*, 8, 2999-3010.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk für die Möglichkeit der Promotion auf dem interessanten und vielschichtigen Gebiet der Furocumarine, die gewährten Freiräume bei der Planung und Durchführung meiner Arbeit und das damit entgegengebrachte Vertrauen, die stete Diskussionsbereitschaft und konstruktiven Anregungen. Vielen Dank für die großartige Zeit und dafür, dass ich bei Ihnen enorm viel lernen konnte.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Helmut Sitzmann für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Mein großer Dank gilt Dr. Karl-Heinz Merz für das akribische Durchforsten meines „Werks“ und die vielen hilfreichen Hinweise und Ratschläge. Deine Gründlichkeit und Konsequenz, mit der Du Deine Entscheidungen vertrittst, haben mich tief beeindruckt.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner „Mittelsfrau“ und Kollegin Christiane Lohr bedanken. Du hast nicht nur mit Deiner fröhlichen Art, aufmunternden Worten und stets einem offenen Ohr den dank Jalousien oft dunklen Laboralltag immer ein wenig heller erscheinen lassen, sondern mir auch bewiesen, dass meine oft recht hohen Erwartungen nicht völlig utopisch, sondern wirklich machbar sind. Dafür, für's Tolerieren unserer Mitbewohner A-H-Hörnchen und für's Korrekturlesen ein großes Dankeschön.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank meinen „Zählfeen“ Monika Groß und Wilja Daub für ihre großartige Unterstützung, wenn ich einfach keine blauen Punkte mehr sehen konnte. Danke, dass Ihr mir nicht nur bei der Laborarbeit unter die Arme gegriffen habt, sondern Euch auch sonst um mich gekümmert und mich mit Wissen und Ratschlägen versorgt habt, die in keinem Lehrbuch stehen.

Meiner „Lieblingskollegin“ Dr. Manuela Göttel möchte ich für die großartige praktische Einführung in die Welt der Kometen danken, die unterhaltsamen Stunden im Labor und den Spaß und die Unterstützung weit darüber hinaus. Bisous!

Bedanken möchte ich mich weiterhin ganz herzlich bei allen Kollegen im AK Schrenk für ihre Unterstützung, nützlichen Ratschläge, tapferes Ertragen meines gelegentlichen Dunkelheit-induzierten Unmuts, für Trost („Och Schätzelein...“), Durchhalteparolen („Joh, mädel net so rum!“) und für „Fruitful discussions“, nicht nur wissenschaftlicher Natur. Wo sonst sollte die tägliche Relevanz von Nutella, „Penguin Poo“ und breitschnäuzigen Kaimanen erörtert werden? Vielen lieben Dank Euch allen!

Ein ganz besonders großes Dankeschön geht an meine Freunde Marc, Marena und Alex mit Anna, Daniela, Lars und Jessi für die seelische und moralische Unterstützung als 24h-Service. Danke, dass ich bei Euch immer ich selbst sein kann und Ihr mich trotzdem versteht. Außerdem vielen Dank dafür, dass ich von Euch lernen konnte, wie man Planung und Spontaneität perfekt kombiniert, Danke für die bestimmt niemals langweilig werdenden running gags über die böse Säure, Lasagne und In-den-Bauch-Boxen, für die Kurse in Kleinkind- und Rechnerwartung, Danielas kleine heile Welt und sowieso dafür, dass alles gut wird.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie, Mami, Daddy, Opa, Oma und Marc für den Beistand in allen Lebenslagen und auch die finanzielle Unterstützung. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Vielen Dank, dass Ihr auch dann an mich geglaubt habt, wenn ich selbst manchmal Zweifel an mir hatte.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig verfasst, die für die Arbeit benutzen Hilfsmittel genannt habe und die Ergebnisse beteiligter Mitarbeiter sowie anderer Autoren klar gekennzeichnet habe. Ich habe weder die Dissertation oder Teile der Dissertation als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht noch ein Promotionsverfahren bei einer Hochschule beantragt.

A handwritten signature in black ink, reading "N. Raquet". The signature is written in a cursive style with a large, stylized 'N' and 'R'.

Kaiserslautern, den 31. Mai 2011

Veröffentlichungen

Originalpublikationen

Raquet, N., H.-J. Schmitz, D. Schrenk (2007) Furocoumarins in phytochemicals: Is there a phototoxic risk? *Planta Med*; 73, 539

Raquet, N. & D. Schrenk (2009) Relative photomutagenicity of furocoumarins and limettin in the hypoxanthine phosphoribosyl transferase assay in V79 cells. *Chem Res Toxicol*, 22, 1639-47.

Lohr, C., N. Raquet & D. Schrenk (2010) Application of the concept of relative photomutagenic potencies to selected furocoumarins in V79 cells. *Toxicol In Vitro*, 24, 558-66.

Gorgus, E., C. Lohr, N. Raquet, S. Guth & D. Schrenk (2010) Limettin and furocoumarins in beverages containing citrus juices or extracts. *Food Chem Toxicol*, 48, 93-8.

Posterbeiträge

Raquet, N., H.-J. Schmitz, D. Schrenk: "Furocoumarins in phytochemicals: Is there a phototoxic risk?", 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medical Plant Research, 2.-6.9.2007 in Graz, Österreich

Raquet, N., H.-J. Schmitz, D. Schrenk: "Furocoumarins in phytochemicals: Is there a phototoxic risk?", Symposium on Biology and Chemistry of Bioactive Natural Products, 19.-21.9.2007 in Kaiserslautern, Deutschland

Raquet, N., H.-J. Schmitz, D. Schrenk: „Furocoumarine in Grapefruitsaft:Gentoxizität und Wirkungen auf den Fremdstoffmetabolismus“, Lebensmittelchemische Gesellschaft Regionaltagung Süd-West, 3.3.2008 in Stuttgart-Hohenheim, Deutschland

Raquet, N., H.-J. Schmitz, D. Schrenk: „Furocoumarine in pflanzlichen Arzneimitteln: Besteht ein phototoxisches Risiko?“, 49. Jahrestagung DGPT, 11.-13.3.2008 in Mainz, Deutschland

Raquet, N., Ch. Lohr, D. Schrenk: „Relative photomutagenic potency of furocoumarins and limettin“, 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 8.-10.9.2008 in Kaiserslautern, Deutschland

Raquet, N., Ch. Lohr, D. Schrenk: „Relative photomutagenic potency of furocoumarins and limettin“, Risk Assessment of Phytochemicals in Food – Novel Approaches, Symposium of the SKLM, 30.3.-1.4.2009 in Kaiserslautern, Deutschland

Raquet, N., D. Schrenk: „Relative photomutagenic potency of furocoumarins and limettin“, 48th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT), 15.- 19.3.2009 in Baltimore, USA

Raquet, N., D. Schrenk: „Relative photomutagenic potency of furocoumarins and limettin“, 46th Congress of the European Societies of Toxicology (Eurotox), 13.-16.9.2009 in Dresden, Deutschland

Raquet, N., D. Schrenk: „Relative photomutagenic potency of furocoumarins and limettin“, 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT), 15.-19.3.2009 in Salt Lake City, USA

Lebenslauf

Persönliche Informationen :

Name: Nicole Raquet
Adresse: Pfaffenbergstraße 34
67663 Kaiserslautern
Telefon: 0171/5288090
0631/3554188
E-Mail: raquet@rhrk.uni-kl.de
Familienstand: ledig
Geburtsdatum: 09.09.1981
Geburtsort: Frankenthal



Schulbildung :

August 1988 – Juli 1992: Besuch der Robert-Schumann-Grundschule Frankenthal
September 1992 – Juni 2001: Besuch des Wilhelm-von-Humboldt-Gymnasiums
Ludwigshafen
13. 06. 2001: Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)
Fremdsprachen: Englisch (verhandlungssicher)
Italienisch (Fortgeschrittene Kenntnisse)
Latein (Schulkenntnisse)

Hochschulausbildung :

Oktober 2001 - März 2007: Studium des Faches Chemie an der
Technischen Universität Kaiserslautern
21. 04. 2004: Vordiplom
August 2004 – November 2004: Forschungspraktikum, Fachrichtung
Lebensmittelchemie/Umwelttoxikologie, an der TU
Kaiserslautern
November 2004 – Februar 2005: Forschungspraktikum, Fachrichtung Anorganische
Chemie, an der TU Kaiserslautern
März 2005 – Juni 2005: Forschungspraktikum, Fachrichtung Organische Chemie,
an der Università degli studi di Catania, Italien

-
- Oktober 2006 - März 2007:** Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. D. Schrenk im Fachbereich Lebensmittelchemie / Toxikologie an der Technischen Universität Kaiserslautern, Thema: „Bestandteile des Sellerie- und Grapefruitsafts als Modulatoren des Fremdstoffmetabolismus“
- 31. 03. 2007:** Abschluss des Studiums als Diplom-Chemikerin
- Seit Mai 2007:** Wissenschaftliche Mitarbeiterin mit dem Ziel der Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. D. Schrenk im Fachbereich Lebensmittelchemie / Toxikologie an der TU Kaiserslautern; Titel der Dissertation: „*In vitro* Untersuchungen zum relativen phototoxischen und photogentoxischen Potential natürlich vorkommender Furocumarine und Limettin“
- 31. 05. 2011:** Abschluss der Promotion

Weiterbildungen:

- Seit Oktober 2009:** Teilnahme am Weiterbildungsprogramm „Fachtoxikologe DGPT“ der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT); besuchte Kurse: Lebensmitteltoxikologie
Molekulare Zelltoxikologie
Fremdstoffallergie/Immuntoxikologie

Weitere Beschäftigungsverhältnisse:

- Juni 2003 - März 2005:** Mentorin des Ada-Lovelace-Projekts an der Technischen Universität Kaiserslautern
- Juli 2002 - März 2004:** Anstellung im Wohnstift Trippstadt der Gemeinschaft Deutsche Altenhilfe (GDA)



Kaiserslautern, den 31.05.2011

Anhang

Nicht gezeigte Ergebnisse des HPRT-Assays

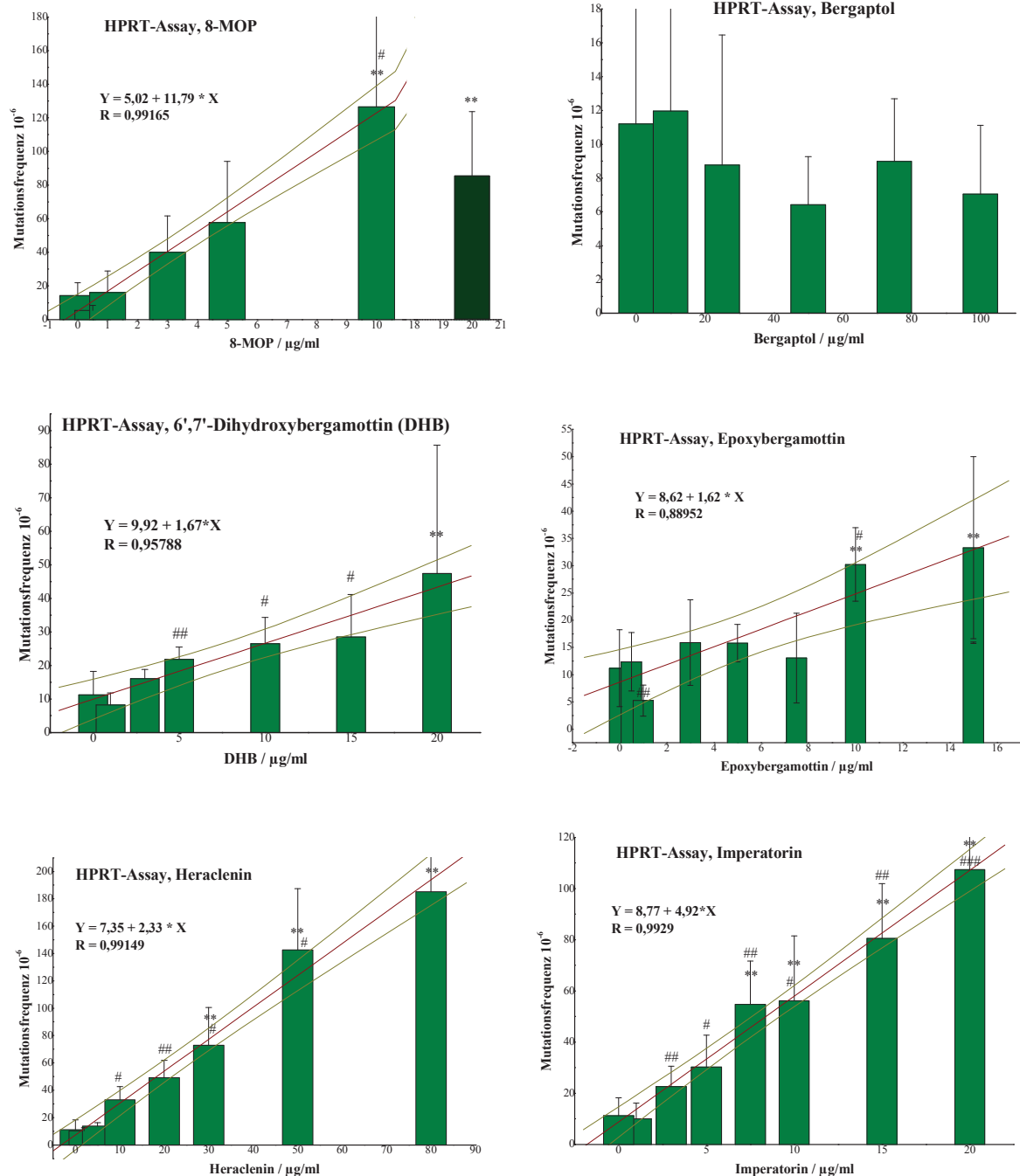


Abb. A1: HPRT-Assay zur Erfassung photogentoxischer Effekte von 8-MOP, Bergaptol, 6',7'-Dihydroxybergamottin, Epoxybergamottin, Heraclenin und Imperatorin. Dargestellt sind die Auftragungen der Mutationsfrequenzen gegen variable FC-Konzentrationen bei Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht und die zugehörigen Linearregressionen mit einem 95%-Konfidenz-Intervall; dunkelgrüne Balken: wegen Zytotoxizität nicht berücksichtigte Werte (n=4; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01, ### ≤ 0,001)

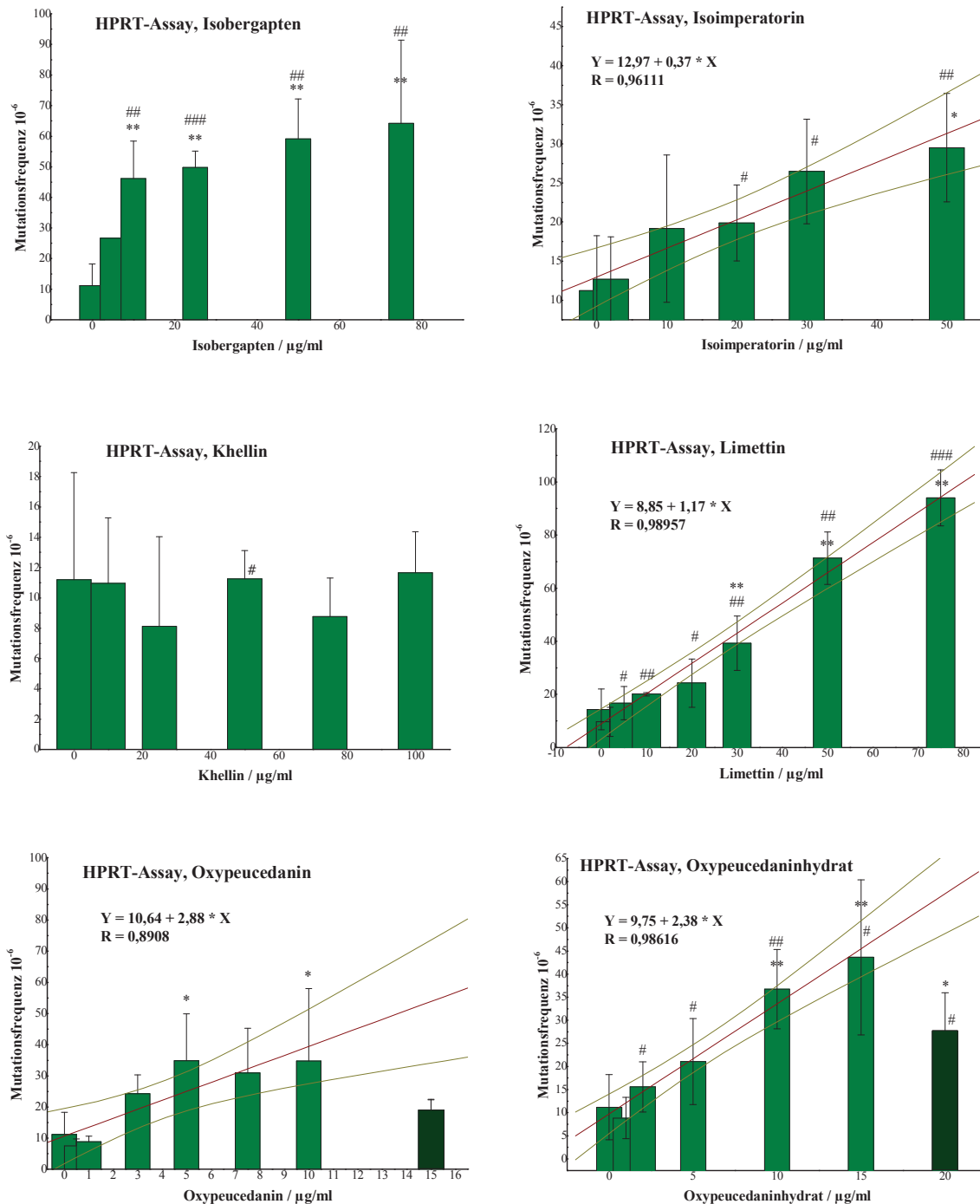


Abb. A2: HPRT-Assay zur Erfassung photogentoxischer Effekte von Isobergapten, Isoimperatorin, Khellin, Limettin, Oxypeucedanin und Oxypeucedaninhydrat. Dargestellt sind die Auftragungen der Mutationsfrequenzen gegen variable FC-Konzentrationen bei Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht und die zugehörigen Linearregressionen mit einem 95%-Konfidenz-Intervall; dunkelgrüne Balken: wegen Zytotoxizität nicht berücksichtigte Werte (n=4; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01, ### ≤ 0,001)

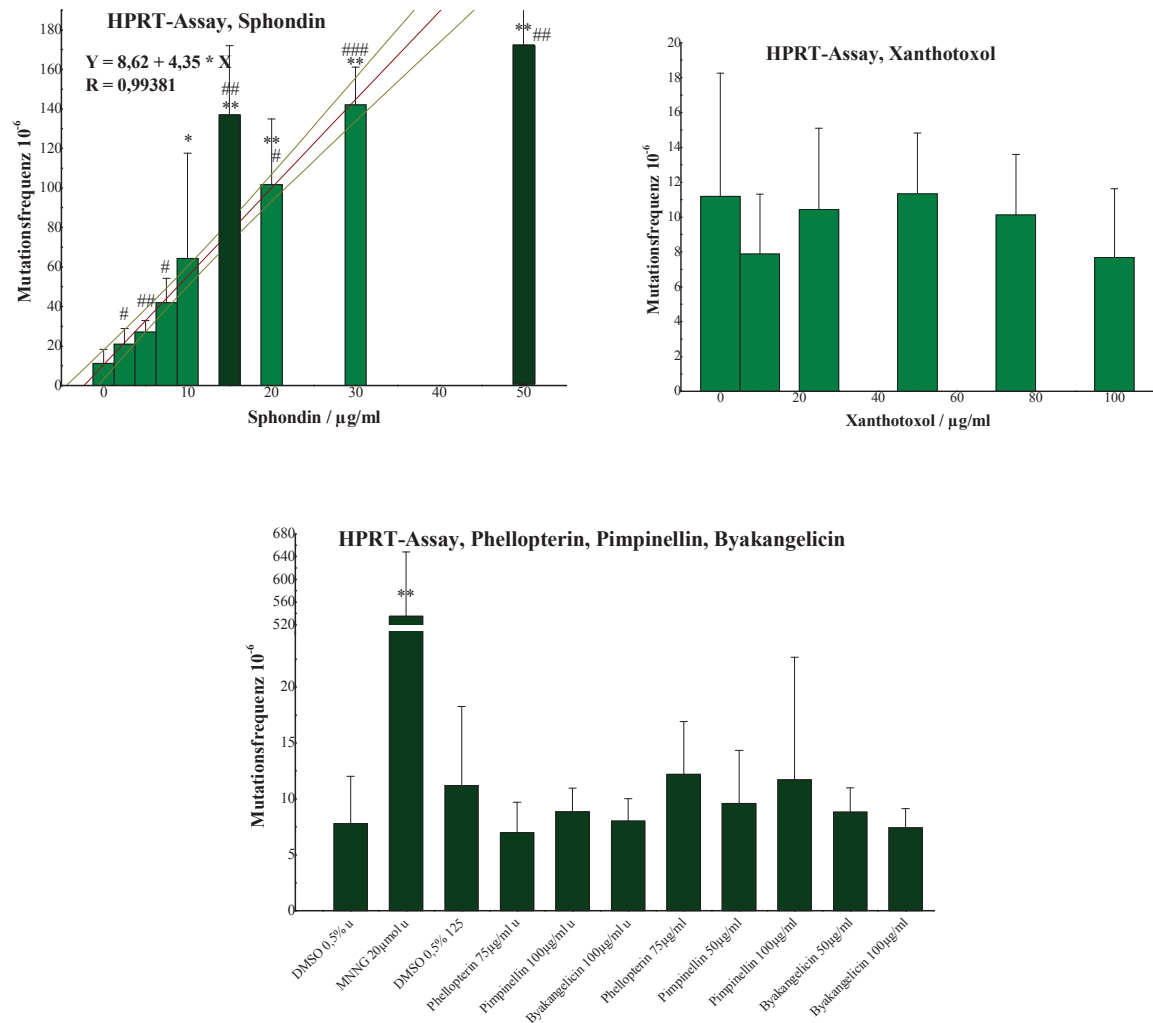


Abb. A3: HPRT-Assay zur Erfassung photogentoxischer Effekte von Sphondin, Xanthotoxol, Phellopterin, Pimpinellin und Byakangelicin. Dargestellt sind die Auftragungen der Mutationsfrequenzen gegen variable FC-Konzentrationen bei Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht und bei Sphondin und Xanthotoxol die zugehörigen Linearregressionen mit einem 95%-Konfidenz-Intervall; dunkelgrüne Balken: wegen Zytotoxizität nicht berücksichtigte Werte (n=4; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA*+*Dunnnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01, ### ≤ 0,001)

Nicht gezeigte Ergebnisse des Mikroerntests

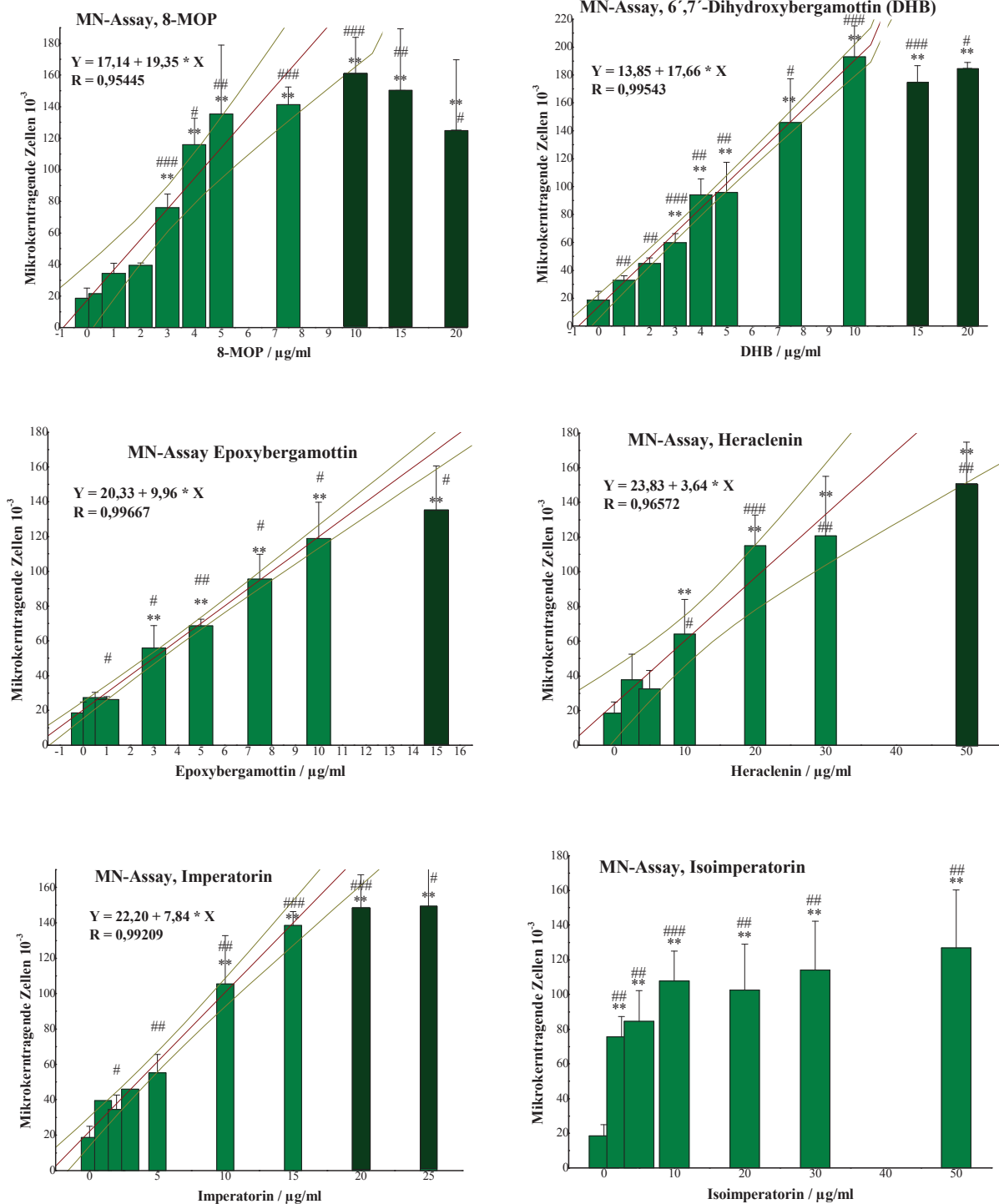


Abb. A4: MNA zur Erfassung photogentoxischer Effekte von 8-MOP, 6',7'-Dihydroxybergamottin, Epoxybergamottin, Heraclenin, Imperatorin und Isoimperatorin. Dargestellt sind die Auftragungen der MNZ gegen variable FC-Konzentrationen bei Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht und die zugehörigen Linearregressionen mit einem 95%-Konfidenz-Intervall; dunkelgrüne Balken: wegen Zytotoxizität / Zytostatik nicht berücksichtigte Werte (n=4; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, $** \leq 0,01$; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, $\# \leq 0,05$, $\#\# \leq 0,01$, $\#\#\# \leq 0,001$)

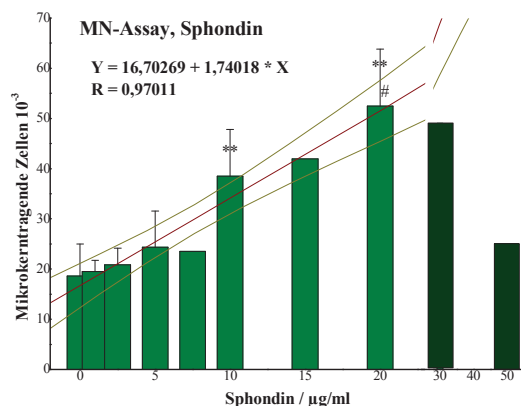
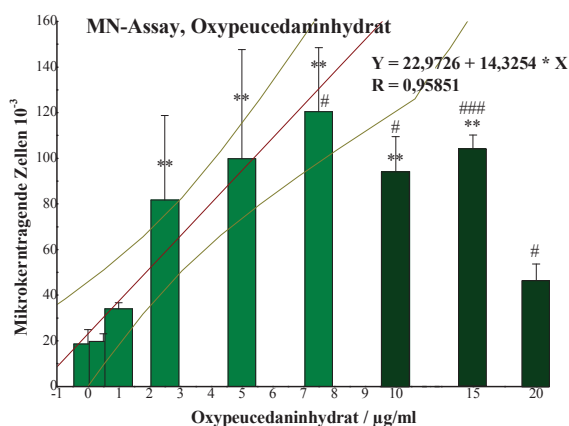
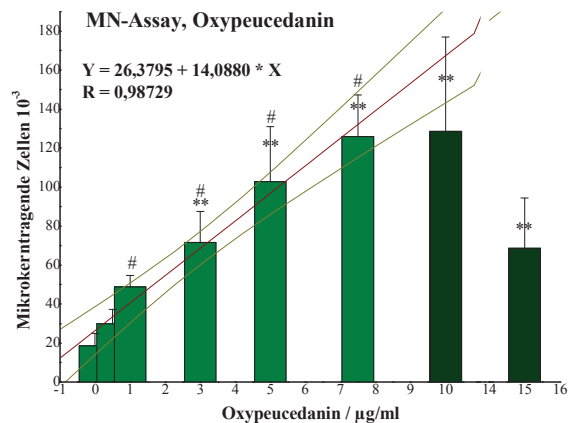
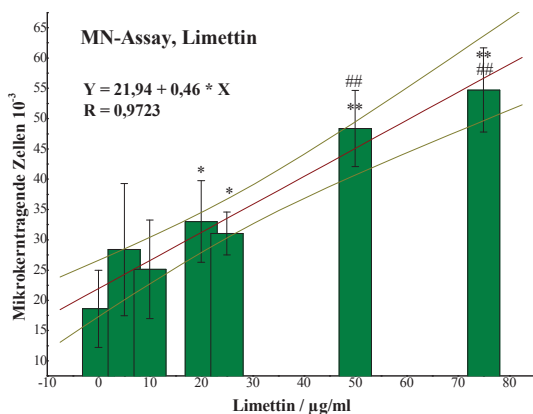


Abb. A5: MNA zur Erfassung photogentoxischer Effekte von Limettin, Oxypeucedanin, Oxypeucedaninhydrat und Sphondin. Dargestellt sind die Auftragungen der MNZ gegen variable FC-Konzentrationen bei Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht und die zugehörigen Linearregressionen mit einem 95%-Konfidenz-Intervall; dunkelgrüne Balken: wegen Zytotoxizität / Zytostatik nicht berücksichtigte Werte (n=4; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test, Welch corrected*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01, ### ≤ 0,001)

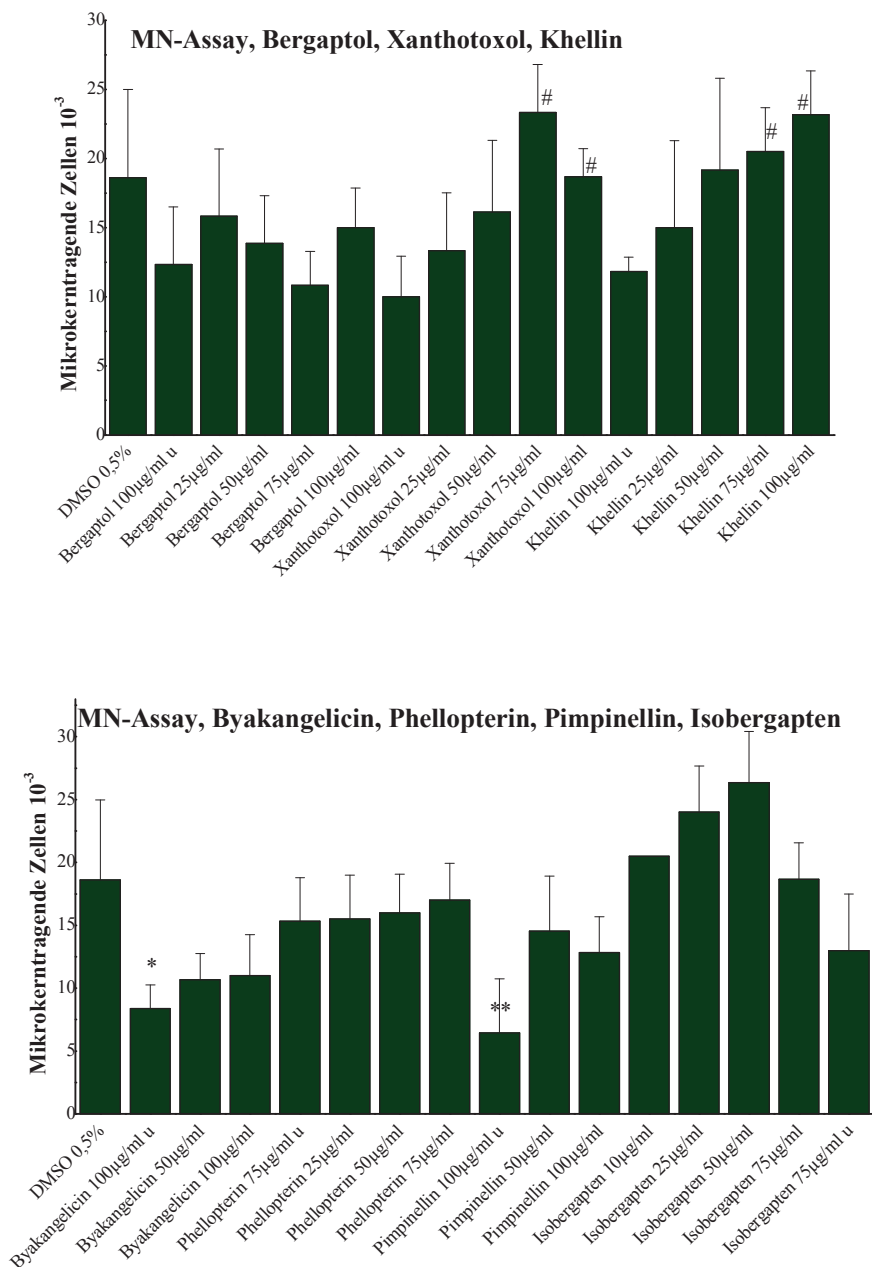


Abb. A6: MNA zur Erfassung photogentoxischer Effekte von Bergaptol, Xanthotoxol, Khellin, Byakangelicin, Phellopterin, Pimpinellin und Isobergapten. Dargestellt sind die Auftragungen der MNZ gegen variable FC-Konzentrationen bei Bestrahlung mit 125 mJ/cm² UVA-Licht; dunkelgrüne Balken: wegen Zytotoxizität / Zytostatik nicht berücksichtigte Werte (n=4; p-value: Medium vs. Behandlung: *one-way ANOVA+Dunnnett's post test*, * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$; unbestrahlt vs. bestrahlt: *two-tailed student's t-test*, *Welch corrected*, # $\leq 0,05$)

Absorptionsspektren der Furocumarine

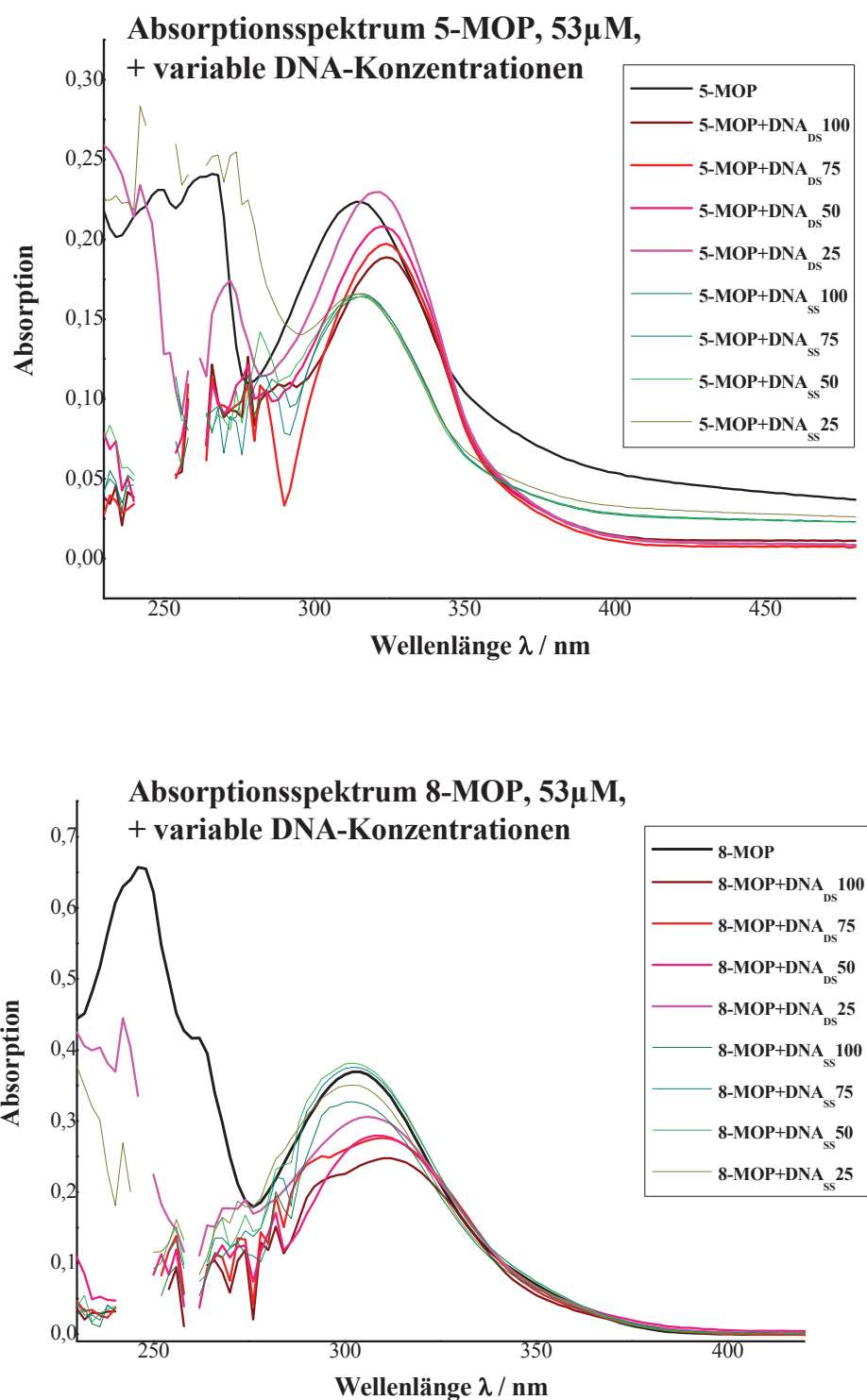


Abb. A7: Absorptionsspektrum von 5-MOP und 8-MOP, 53 μ M in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1, in Kombination mit verschieden konzentrierter doppel- und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA_{DS} bzw. DNA_{SS}; Konzentrationen 0, 25, 50, 75 & 100 * 53 μ M bezogen auf ein Nukleotid)

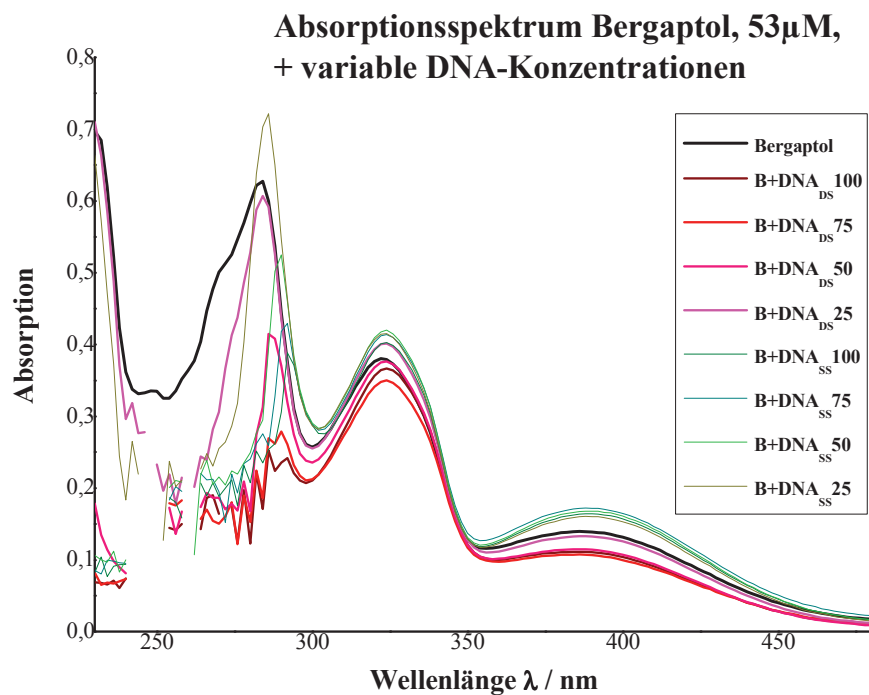
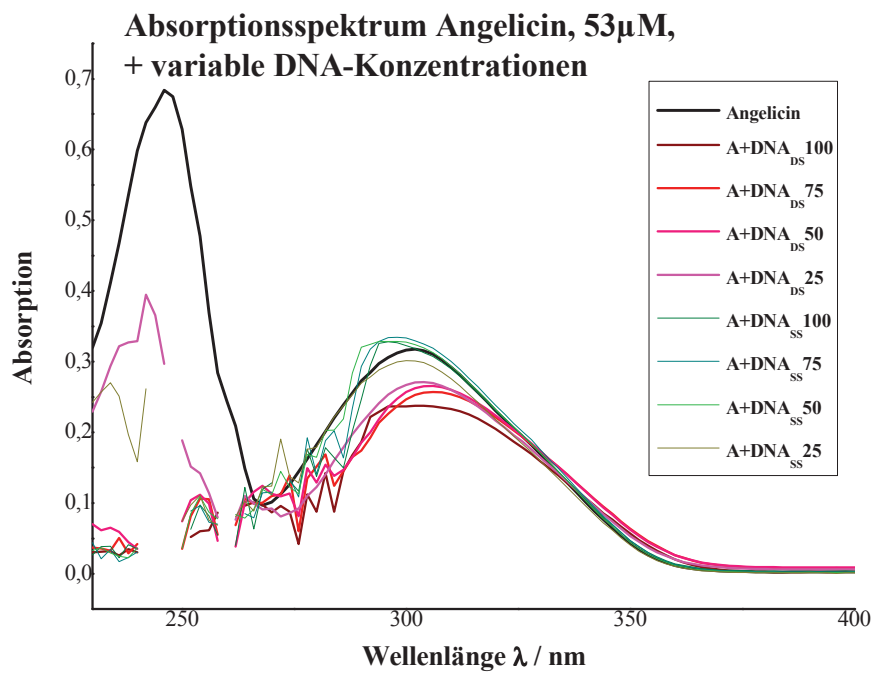


Abb. A8: Absorptionsspektrum von Angelicin und Bergaptol, 53 μ M in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1, in Kombination mit verschieden konzentrierter doppel- und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA_{DS} bzw. DNA_{SS}; Konzentrationen 0, 25, 50, 75 & 100 * 53 μ M bezogen auf ein Nukleotid)

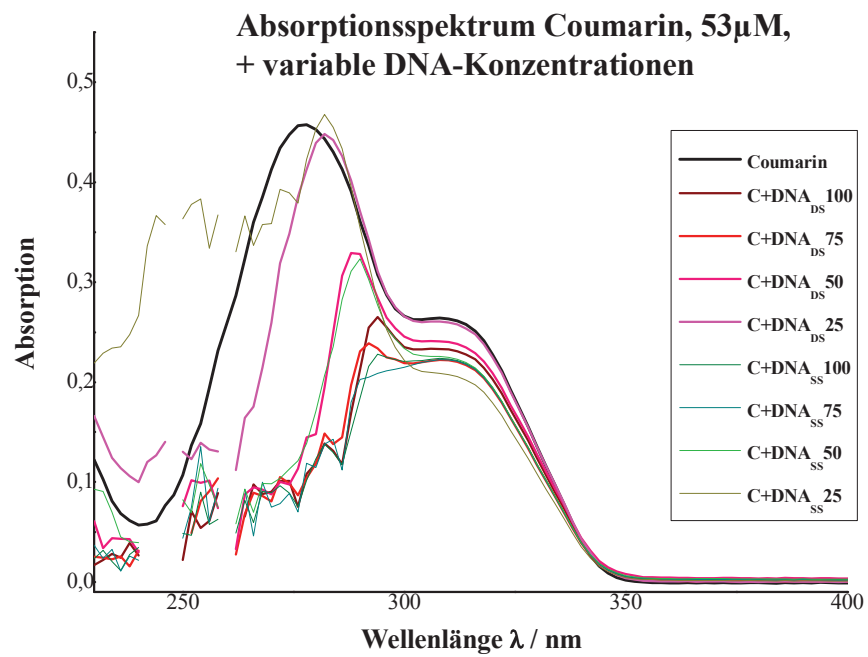
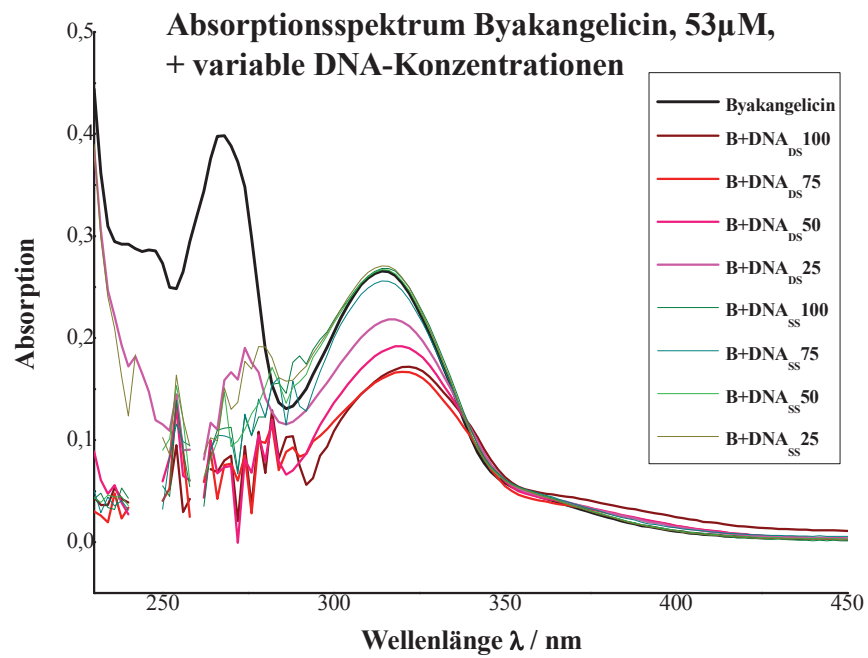


Abb. A9: Absorptionsspektrum von Byakangelicin und Coumarin, 53 μ M in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1, in Kombination mit verschieden konzentrierter doppel- und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA_{DS} bzw. DNA_{SS}; Konzentrationen 0, 25, 50, 75 & 100 * 53 μ M bezogen auf ein Nukleotid)

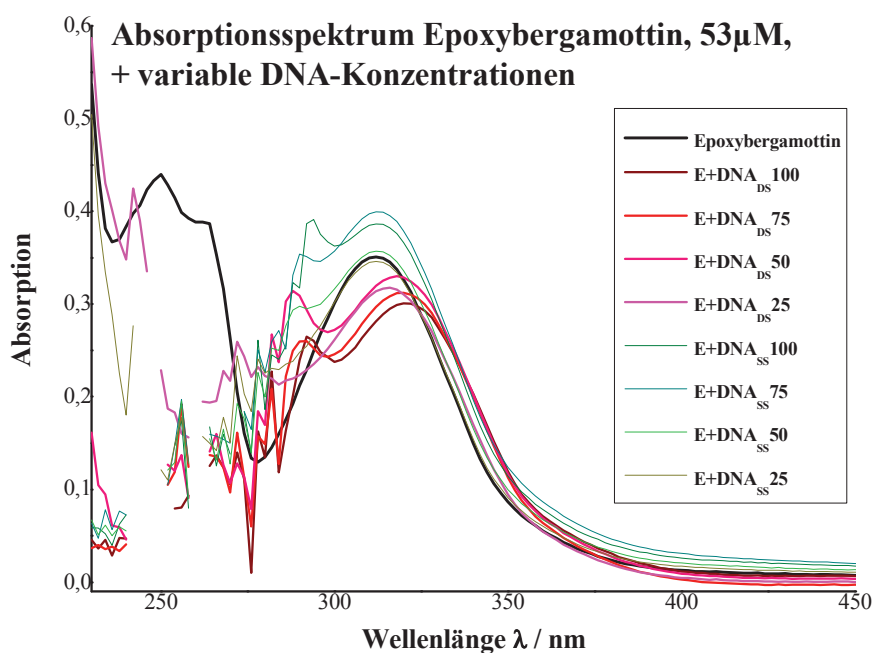
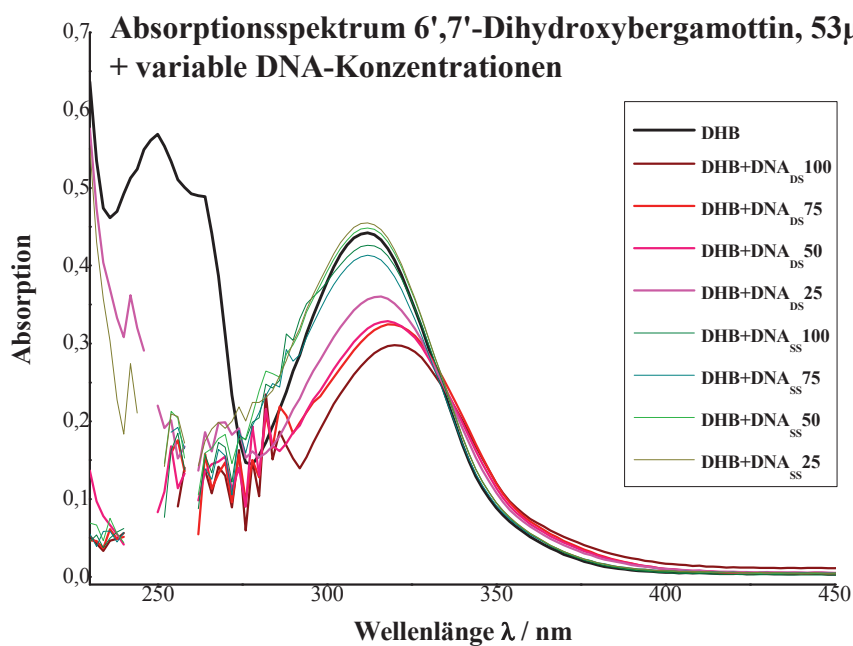


Abb. A10: Absorptionsspektrum von 6',7'-Dihydroxybergamottin und Epoxybergamottin, 53 μ M in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1, in Kombination mit verschieden konzentrierter doppel- und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA_{DS} bzw. DNA_{SS}; Konzentrationen 0, 25, 50, 75 & 100 * 53 μ M bezogen auf ein Nukleotid)

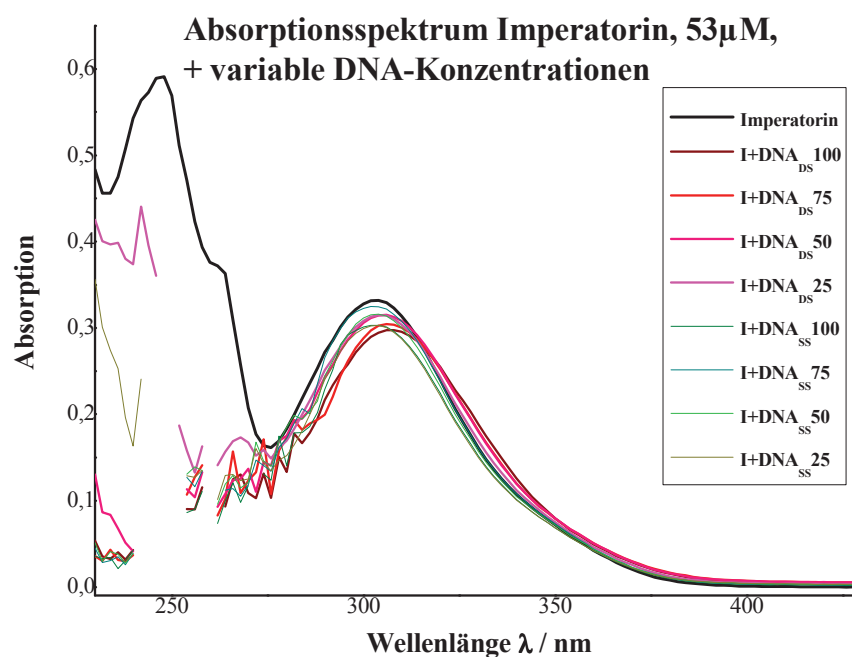
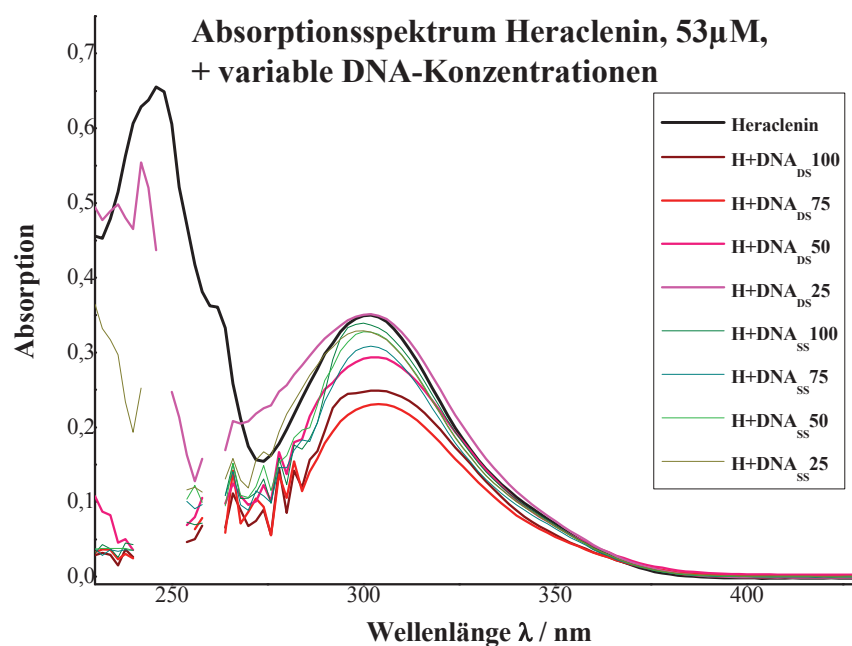


Abb. A11: Absorptionsspektrum von Heraclenin und Imperatorin, 53 μ M in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1, in Kombination mit verschieden konzentrierter doppel- und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA_{DS} bzw. DNA_{SS}; Konzentrationen 0, 25, 50, 75 & 100 * 53 μ M bezogen auf ein Nukleotid)

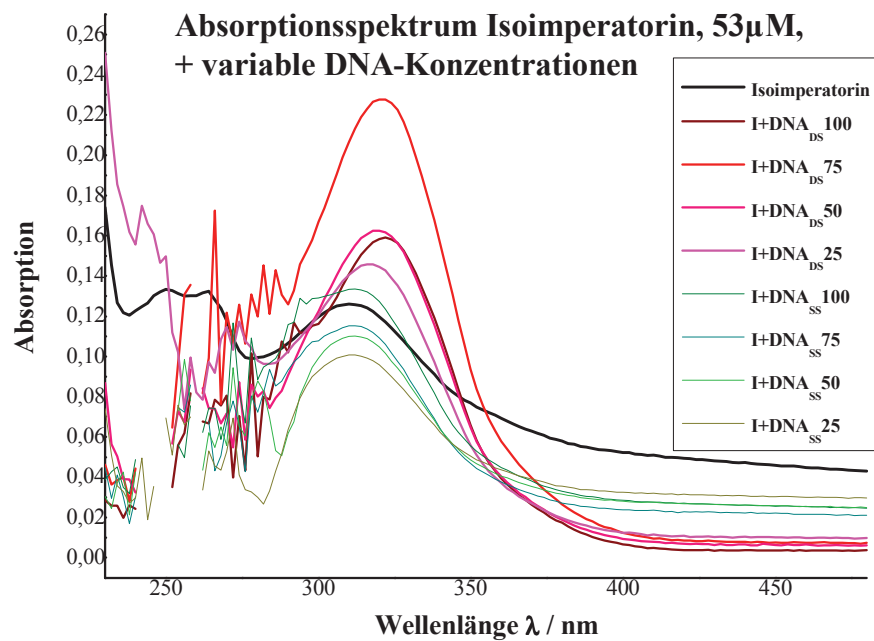
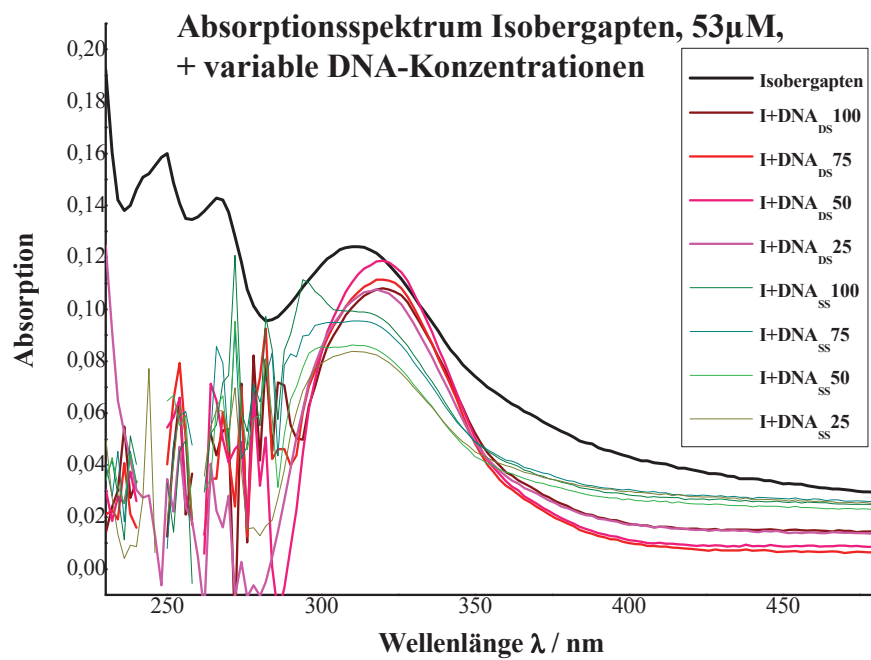


Abb. A12: Absorptionsspektrum von Isobergapten und Isoimperatorin, 53 μ M in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1, in Kombination mit verschieden konzentrierter doppel- und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA_{DS} bzw. DNA_{SS} ; Konzentrationen 0, 25, 50, 75 & 100 * 53 μ M bezogen auf ein Nukleotid)

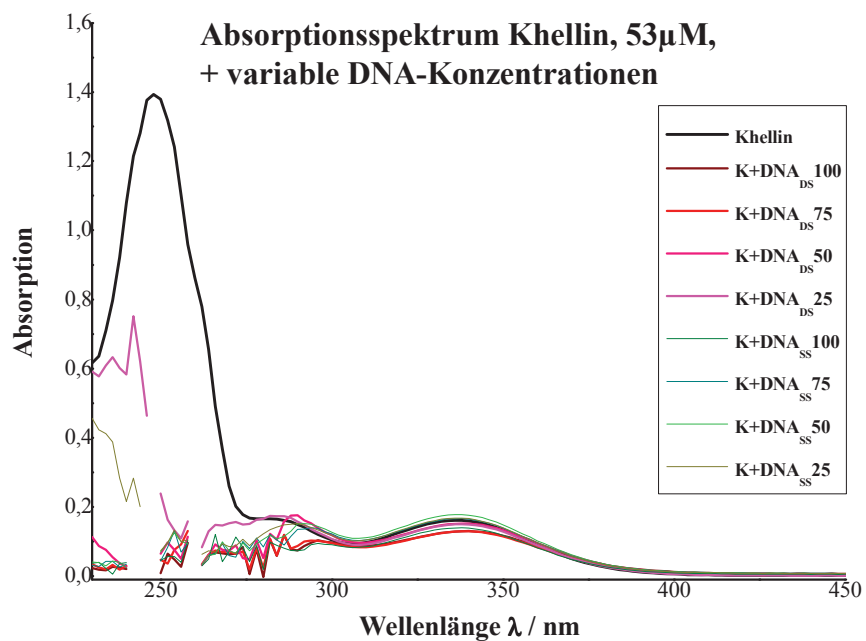
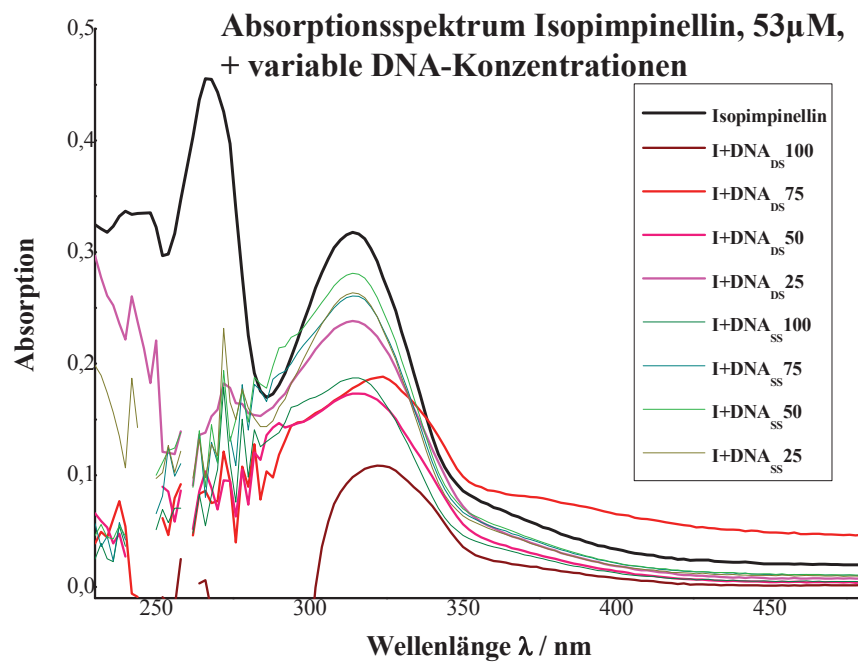


Abb. A13: Absorptionsspektrum von Isopimpinellin und Khellin, 53 μ M in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1, in Kombination mit verschieden konzentrierter doppel- und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA_{DS} bzw. DNA_{SS} ; Konzentrationen 0, 25, 50, 75 & 100 * 53 μ M bezogen auf ein Nukleotid)

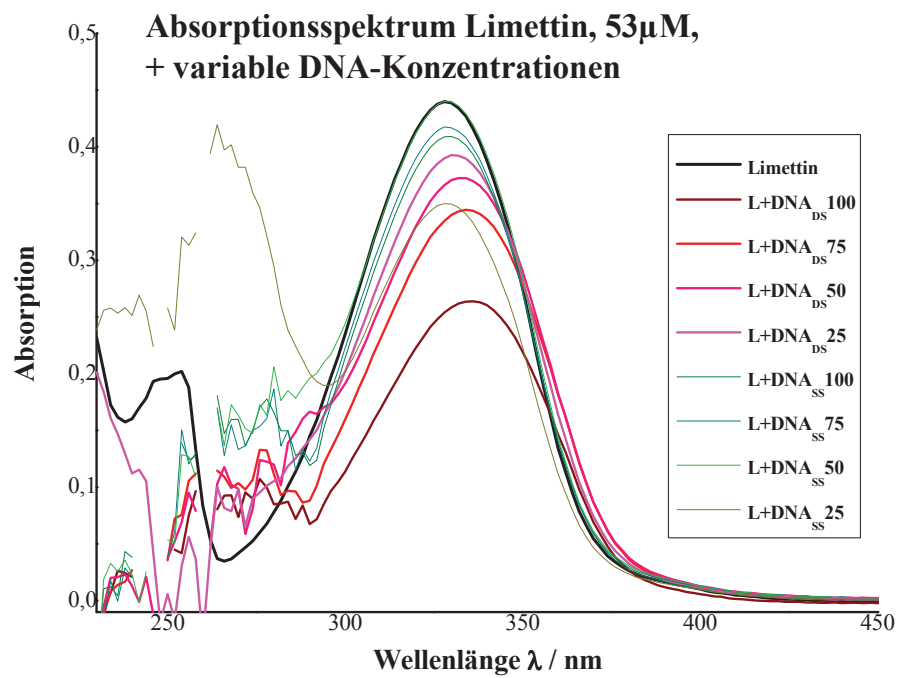
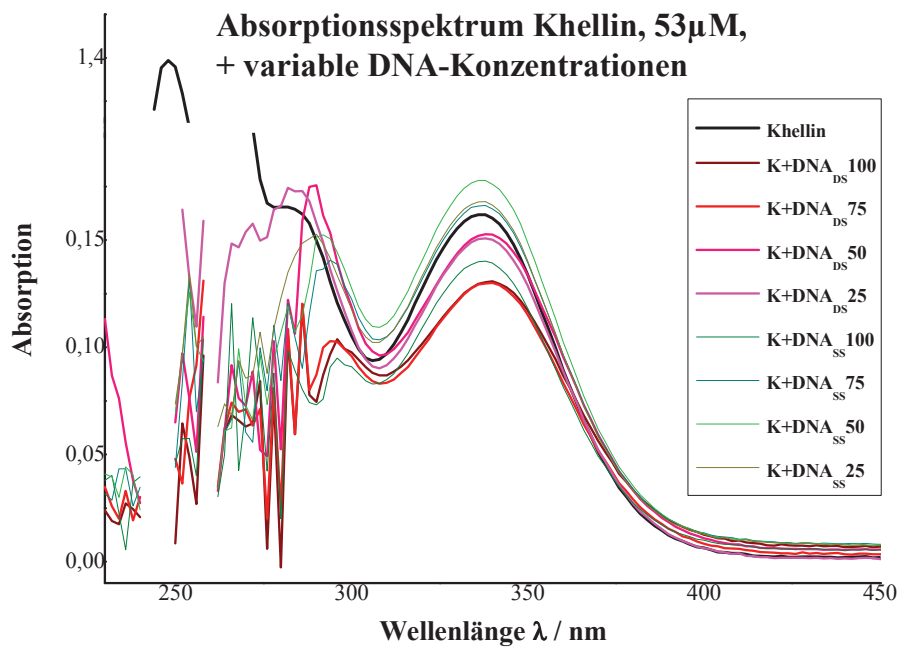


Abb. A14: Absorptionsspektrum von Khellin (vergrößert) und Limettin, 53 μ M in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1, in Kombination mit verschieden konzentrierter doppel- und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA_{DS} bzw. DNA_{SS}; Konzentrationen 0, 25, 50, 75 & 100 * 53 μ M bezogen auf ein Nukleotid)

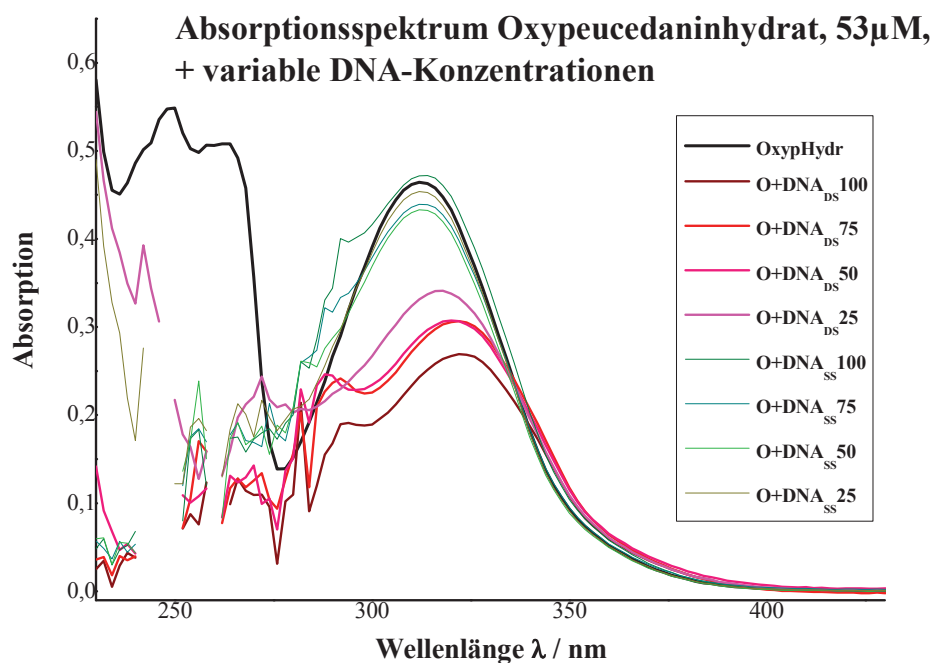
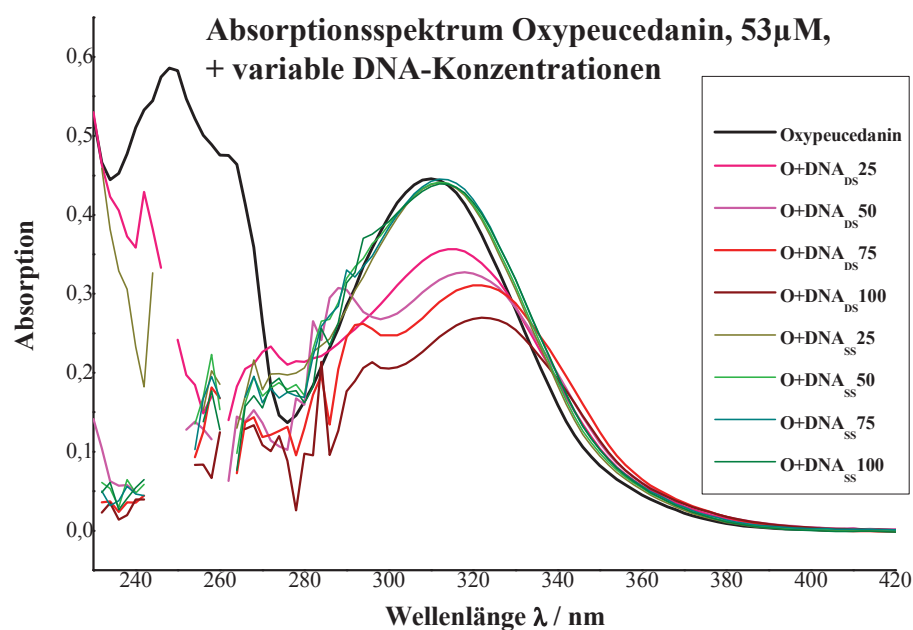


Abb. A15: Absorptionsspektrum von Oxypeucedanin und Oxypeucedaninhydrat, 53 μ M in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1, in Kombination mit verschieden konzentrierter doppel- und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA_{DS} bzw. DNA_{SS}; Konzentrationen 0, 25, 50, 75 & 100 * 53 μ M bezogen auf ein Nukleotid)

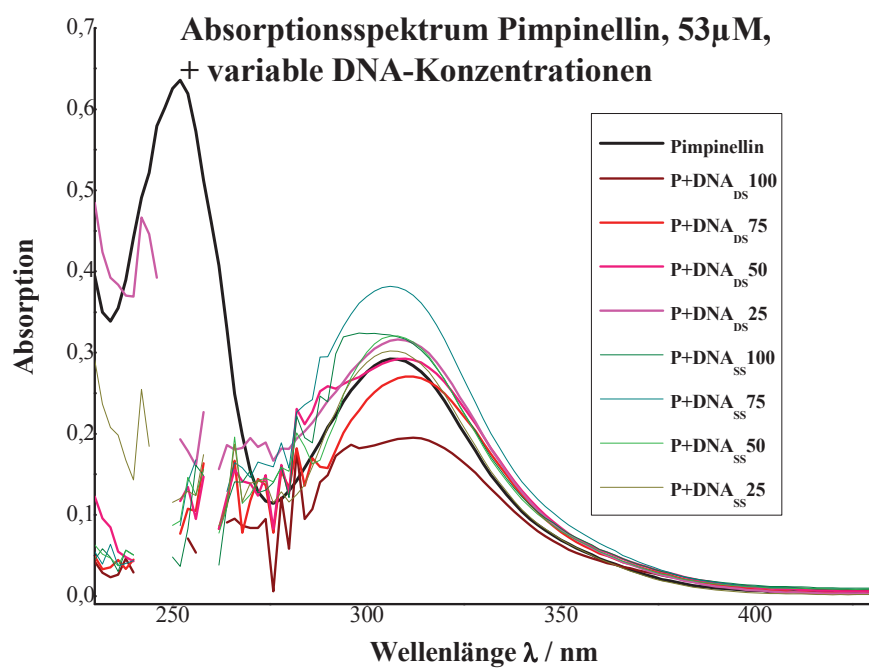
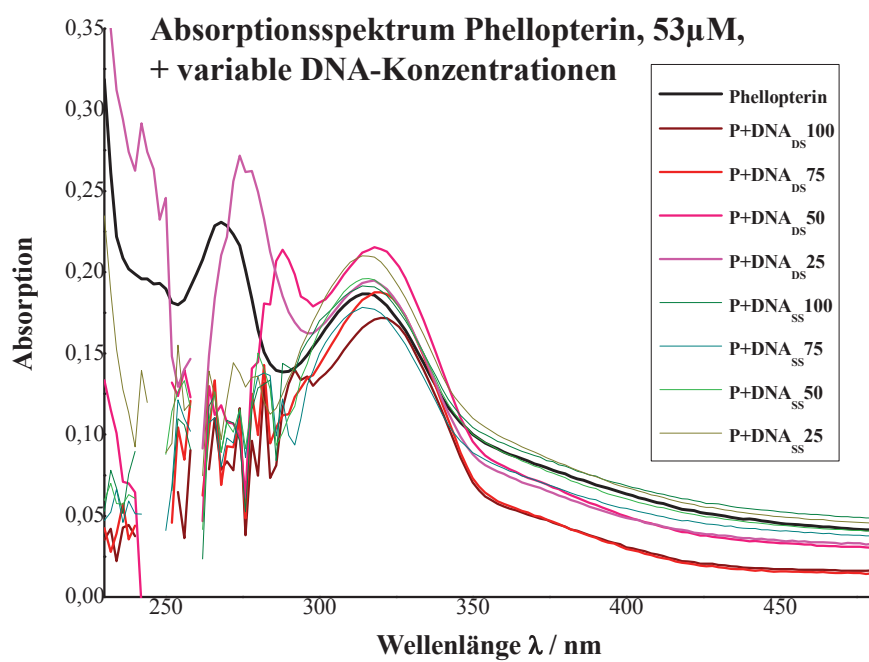


Abb. A16: Absorptionsspektrum von Phellopterin und Pimpinellin, 53 μ M in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1, in Kombination mit verschieden konzentrierter doppel- und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA_{DS} bzw. DNA_{SS}; Konzentrationen 0, 25, 50, 75 & 100 * 53 μ M bezogen auf ein Nukleotid)

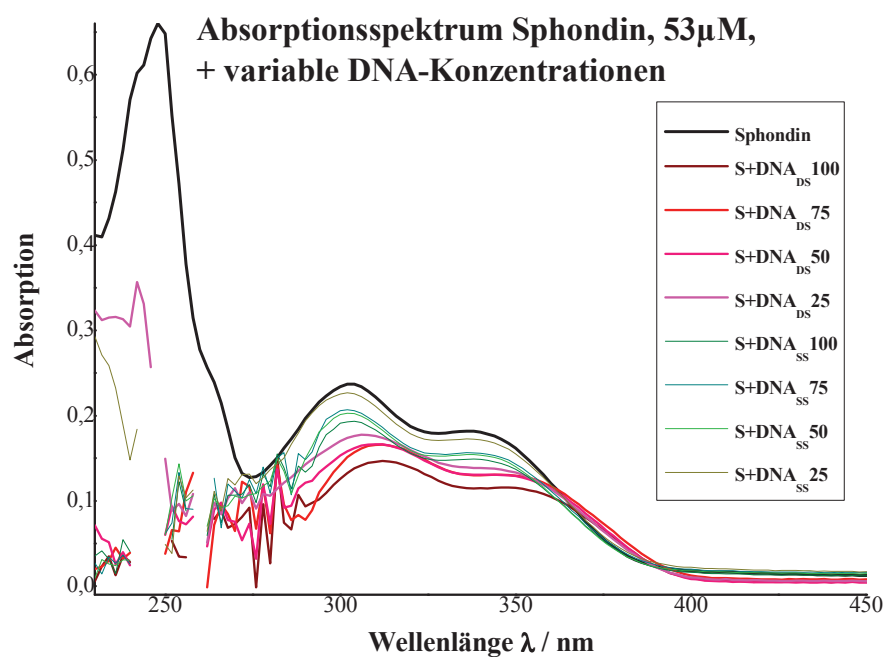
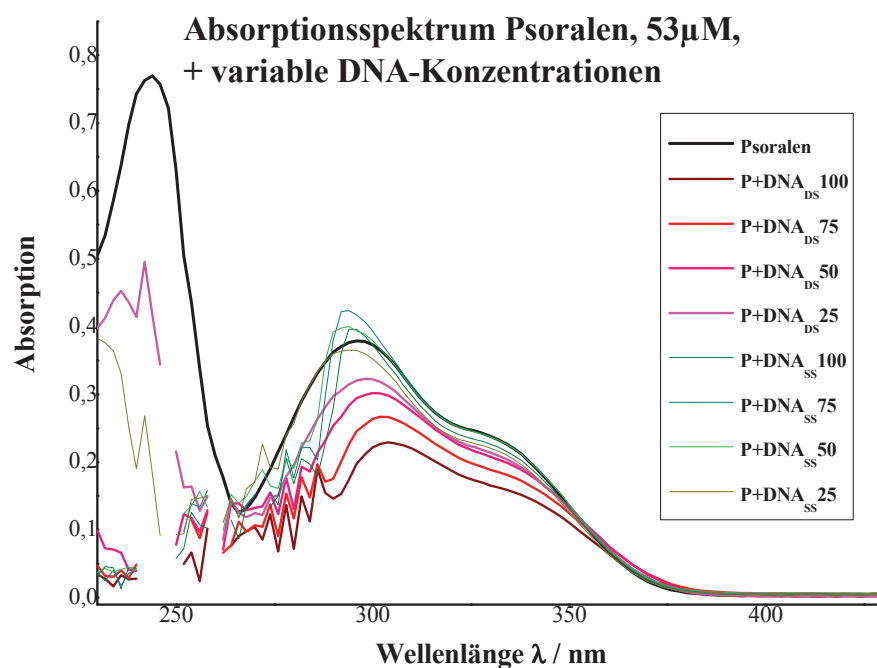


Abb. A17: Absorptionsspektrum von Psoralen und Sphondin, 53 μ M in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1, in Kombination mit verschieden konzentrierter doppel- und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA_{DS} bzw. DNA_{SS}; Konzentrationen 0, 25, 50, 75 & 100 * 53 μ M bezogen auf ein Nukleotid)

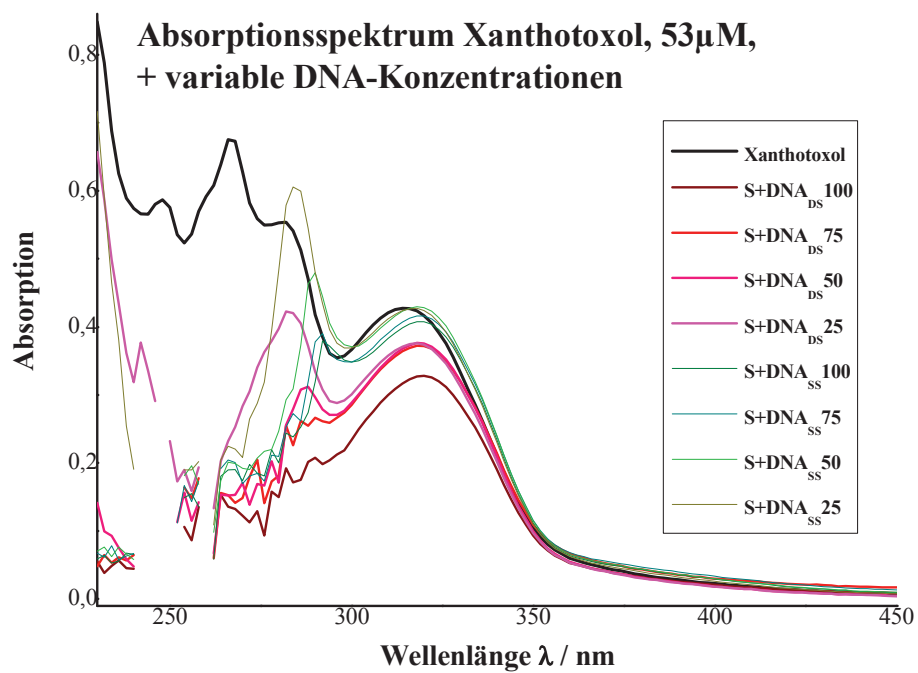
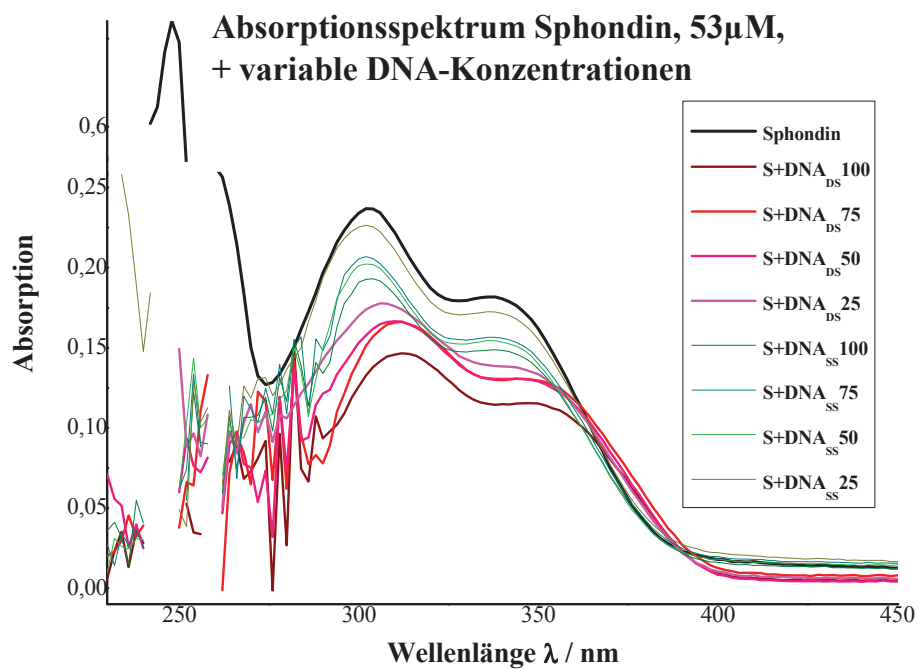


Abb. A18: Absorptionsspektrum von 5-MOP und 8-MOP, 53 μ M in 0,3 mM NaPi-Puffer, pH=7,1, in Kombination mit verschieden konzentrierter doppel- und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (DNA_{DS} bzw. DNA_{SS}; Konzentrationen 0, 25, 50, 75 & 100 * 53 μ M bezogen auf ein Nukleotid)

Positivkontrollen im Ethidiumbromid- und Hoechst33258-Verdrängungsassay

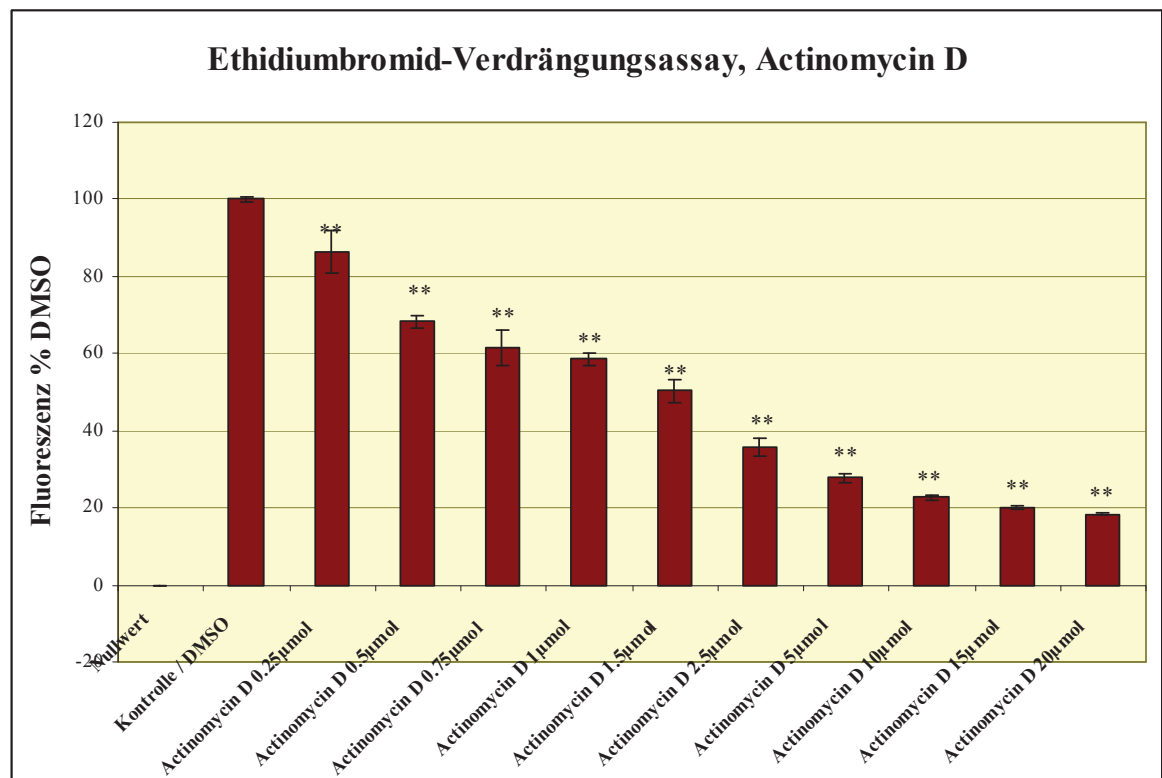


Abb. A19: Ethidiumbromid-Kompetitionsassay von Actinomycin D, EtBr-Fluoreszenzintensitäten relativ zur DMSO-Kontrolle (n=3; p-value: DMSO vs. Substanz: *one-way* ANOVA+*Dunnnett's post test*, * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$)

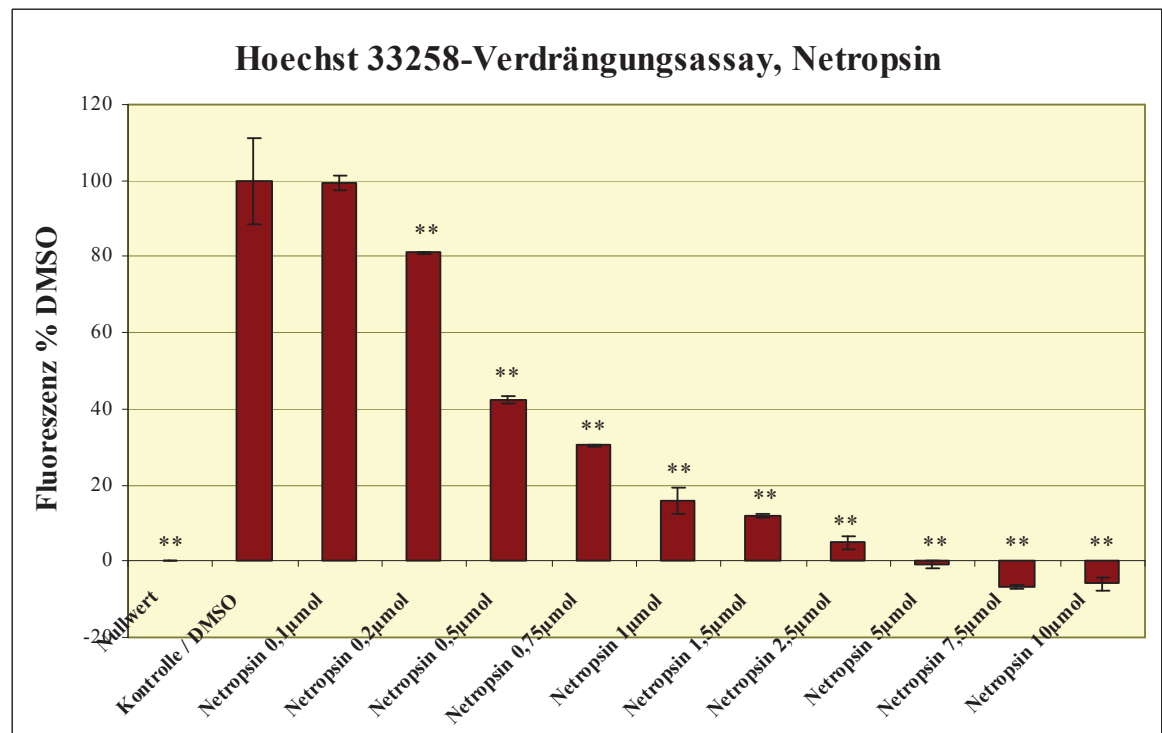


Abb. A20: Hoechst 33258-Kompetitionsassay von Netropsin, H33258-Fluoreszenzintensitäten relativ zur DMSO-Kontrolle (n=3; p-value: DMSO vs. Substanz: *one-way* ANOVA+*Dunnnett's post test*, * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$)